



**Iridovírus da fauna portuguesa: contributo para a
caracterização molecular e avaliação da suscetibilidade a
antivirais**

Jorge André Mocho Figueiredo

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Maria Filomena Caeiro (CESAM - FCUL)

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Filomena Caeiro, por me ter aceite como aluno de mestrado, por toda a ajuda, disponibilidade, paciência e amizade durante a realização deste projeto.

À Professora Doutora Luísa Serralheiro e Doutor Pedro Falé, pela generosidade e disponibilidade.

À Doutora Teresa Granja e Marta Costa por todos os esclarecimentos, ajuda e disponibilidade.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo durante toda esta etapa académica.

À Ana Rita Mendes por toda a ajuda, aconselhamento e amizade no dia-a-dia laboratorial durante a realização deste projeto.

Aos meus amigos e colegas de mestrado com quem partilhei em simultâneo esta etapa académica, pelo apoio e boa disposição.



**Ciências
ULisboa** | **Biologia
Vegetal**



cesam

universidade de aveiro
centro de estudos do ambiente
e do mar

Iridovírus da fauna portuguesa: contributo para a caracterização molecular e avaliação da suscetibilidade a antivirais

Jorge André Mocho Figueiredo

2017

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro – Pólo FCUL (CESAM FCUL) sob a orientação direta da Professora Doutora Maria Filomena Caeiro no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Resumo

Os *Iridoviridae* são vírus com um genoma de cadeia dupla de DNA com de 140 a mais de 200 kpb, circularmente permutado e com redundância terminal. São infecciosos para invertebrados como insetos ou crustáceos e para vertebrados heterotérmicos. Nesta família estão incluídos cinco gêneros: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Megalocytivirus* e *Lymphocytivirus*.

Neste trabalho foram avaliados apenas vírus do gênero *Ranavirus*. A estirpe tipo é o *Frog vírus 3* (FV3) cujo ciclo replicativo, que tem servido de modelo para todos os membros da família, inicia-se no núcleo da célula hospedeira e completa-se no citoplasma, particularidade esta que faz com que os iridovírus sejam inseridos no grupo *Nucleo-cytoplasmic large DNA viruses* (NCLDV).

Os iridovírus são considerados patógenos emergentes, sendo responsáveis por graves perdas econômicas em peixes de aquacultura e por declínios bruscos e acentuados de populações de répteis e anfíbios. Dada a quase ausência de antivirais efetivos para estes vírus, decidiu-se avaliar se um extrato aquoso de *Solidago virgaurea* L. (família Asteraceae), com efeito anti-herpético demonstrado no nosso laboratório, também possuía algum efeito sobre os iridovírus.

Todos os ensaios de atividade antiviral envolveram a titulação dos vírus tratados e/ou produzidos na presença do extrato e ulterior comparação dos títulos obtidos relativamente às situações controle, sem tratamento. Nas experiências realizadas neste trabalho, que implicaram a produção, replicação e titulação de vírus, foram utilizadas as linhas celulares Vero e Vero E6.

O extrato aquoso (designado por E6 neste trabalho) foi preparado por decocção de caules e folhas verdes. Fez-se a sua análise por HPLC, tendo-se avaliado a sua citotoxicidade relativamente à linha celular Vero E6, em culturas com dois níveis de confluência celular. A concentração que reduz para 50% a viabilidade celular (CC_{50}) é de 255,3 $\mu\text{g/mL}$ nas culturas mais confluentes e de 172,8 $\mu\text{g/mL}$ nas culturas menos confluentes.

Os efeitos de E6 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (concentração com uma citotoxicidade inferior a 10%) sobre a partícula viral (efeito virucida) e na produção de novas partículas virais num único ciclo replicativo foram avaliados. Os resultados apontam para a inexistência de efeito virucida, tendo sido confirmada a inibição da produção de novas partículas virais em células infetadas na presença do extrato. Com estes ensaios, foi possível determinar a concentração de extrato que reduz a produção viral em 50% e em 90% (respetivamente IC_{50} e IC_{90}) nas duas linhas celulares. Para Vero o IC_{50} é 36,7 $\mu\text{g/mL}$ e o IC_{90} é 94,3 $\mu\text{g/mL}$ enquanto para Vero E6 o IC_{50} é 18,8 $\mu\text{g/mL}$ e o IC_{90} é 47,3 $\mu\text{g/mL}$. Com estes resultados, determinou-se o índice de seletividade (SI) que relaciona os valores obtidos de IC_{50} e CC_{50} , sendo de 9,22 para Vero E6.

Dado existirem no nosso Laboratório vários isolados de ranavírus ainda insuficientemente caracterizados, estes foram utilizados como contributo para a confirmação e aprofundamento das ferramentas moleculares de caracterização destes vírus. Foram avaliados e comparados através da análise de variabilidade do número de nucleótidos uma região microsatélite, pela pesquisa da existência ou não de uma deleção num gene codificante para um fator de virulência putativo (vIF-2 α) e ainda por sequenciação parcial de um gene codificante para uma proteína de reparação de DNA putativa, habitualmente não considerada neste tipo de análises comparativas. Estas abordagens foram levadas a cabo com amplificação de DNA viral por PCR, utilizando *primers* específicos para cada uma destas regiões, previamente descritos ou desenhados por nós.

Para o estudo da região microssatélite foi necessário otimizar as condições de eletroforese, tendo-se concluído que a melhor resolução para a dimensão dos amplicões a avaliar, era obtida em geis de agarose a 4% em tampão SGTB (GRiSP Research Solutions, Portugal). Os produtos de eletroforese foram analisados no *software* Image Lab (Bio-Rad Laboratories) e desta análise resultou a deteção de uma diferença de um nucleótido entre os isolados BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 e o isolado 2000/99, o que não garante uma diferenciação segura entre estes isolados. Entre os isolados FV3 e LMo resultou uma diferença de quatro nucleótidos, como já observado anteriormente por outros autores.

Quanto ao gene vIF-2 α , foram obtidos produtos de amplificação com cerca de 1050 pb para os isolados BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 e 2000/99 e com cerca de 250 pb para os isolados FV3 e LMo, confirmando-se a existência de vírus com uma deleção neste gene, não sendo o caso dos isolados portugueses em avaliação, que também não se distinguem entre si e do isolado 2000/99.

Relativamente ao gene codificante para a proteína de reparação de DNA putativa, foi necessário desenhar *primers* específicos para esta região, tendo por base as sequências conhecidas dos vírus FV3 e 2000/99. As amostras foram amplificadas com sucesso e sequenciadas por método de Sanger. No alinhamento das sequências obtidas, com cerca de 1030 nucleótidos, não foram detetadas diferenças entre os isolados BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 e 2000/99, tendo sido detetada a diferença em apenas um único nucleótido, entre FV3 e LMo. Este resultado e a diferença no número de nucleótidos encontrada na região microssatélite, permitem propor que os vírus LMo e FV3 são estirpes diferentes da mesma espécie.

Os resultados deste trabalho realçam a necessidade de identificar outras regiões do genoma dos iridovírus que permitam uma melhor discriminação entre estirpes afins.

Palavras-chave: *Iridoviridae*; Atividade antiviral; Citotoxicidade; Caracterização molecular

Abstract

Iridoviridae are viruses with a double-stranded DNA genome with 140 to more than 200 kbp, circularly permuted and terminally redundant. They are infectious to invertebrates like insects or crustaceans and to ectothermic vertebrates. Five genera are included in this family: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Megalocytivirus* e *Lymphocytivirus*.

In this project, only the genus *Ranavirus* was evaluated. The type strain is *Frog virus 3* (FV3) whose replication cycle, which has served as model for all members of this family, initiates in the host cell nucleus and completes in the cytoplasm, this feature giving iridovirus a place in the *Nucleo-cytoplasmic large DNA viruses* (NCLDV) group.

Iridovirus are considered emerging pathogens, being responsible for severe economic loss in aquacultures and for sudden and sharp population declines in reptiles and amphibians. Given the lack of effective antivirals for these viruses, we decided to evaluate if an aqueous extract from *Solidago virgaurea* L. (Family Asteraceae), with positive anti-herpetic effect proven in our laboratory, also has any effect against iridoviruses.

All the assays of antiviral activity involved the titration of treated viruses and/or produced in the presence of extract and posterior comparison of the obtained titers relative to the controls, without any treatment. The experiments in this project that involved production, replication and titration of viruses were carried out in Vero and Vero E6 cell lines.

The aqueous extract (designed as E6 in this project) was prepared by decoction of green stems and leaves. We analyzed it by HPLC, and the cytotoxicity for Vero E6 cells, in cultures with two levels of cell confluence. The concentration that reduces cell viability to 50% (CC₅₀) is 255.3 µg/mL in more confluent cultures and 172.8 µg/mL in less confluent cultures.

The effects of E6 at 100 µg/mL (concentration with less than 10% cytotoxicity) against the viral particle (virucidal effect) and in the production of new viral particles during a single replication cycle were evaluated. Results point to the absence of virucidal effect and the inhibition of production of new viral particles in infected cells while in the presence of the extract. With these assays, it was possible to determine the concentration of extract that reduces viral production by 50% and 90% (respectively IC₅₀ e IC₉₀) in both cell lines. For Vero the IC₅₀ is 36.7 µg/mL and the IC₉₀ is 94.3 µg/mL while for Vero E6 the IC₅₀ is 18.8 µg/mL and the IC₉₀ is 47.3 µg/mL. With these results, we determined the selectivity index (SI) which relates IC₅₀ and CC₅₀, with a value of 9.22 for Vero E6.

Given that we possess several ranaviruses isolates in our laboratory still insufficiently characterized, we used them as contribution for the confirmation and deepening of the molecular tools used in characterization of these viruses. They were evaluated and compared by analyzing the variability in nucleotide numbers of a microsatellite region, searching for the existence or absence of a deletion in a gene coding for a putative virulence factor (vIF-2α) and by partially sequencing a gene coding for a putative DNA repair protein, not usually considered in these comparative analyses. These approaches were done by amplifying viral DNA by PCR, using specific primers designed in the scope of this study or previously described for each one of these regions.

For the study of the microsatellite region, we needed to optimize the electrophoresis conditions, concluding that the best resolution for the dimension of the amplicons we wanted to evaluate was obtained in 4% agarose gels in SGTB buffer (GRiSP Research Solutions, Portugal). The

electrophoresis products were analyzed in the Image Lab software (Bio-Rad Laboratories) which showed one nucleotide difference between the isolates BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 and the isolate 2000/99, which does not guarantee a safe differentiation between these isolates. A four nucleotides difference was observed between the isolates FV3 and LMo, as previously detected by other authors.

Regarding the vIF-2 α gene, we obtained amplification products with about 1050 bp for the isolates BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 and 2000/99 and with about 250 bp for the isolates FV3 and LMo, confirming the existence of viruses with a deletion in this gene, which is not the case of the Portuguese isolates under evaluation, not being possible to be distinguished between themselves and the isolate 2000/99.

Regarding the gene that codes for the putative DNA repair protein, we needed to design specific primers for this region, based on known sequences of FV3 and 2000/99. The samples were successfully amplified and sequenced by Sanger method. In the alignment of these sequences, with about 1030 nucleotides, differences were not detected between the isolates BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 and 2000/99, and a single nucleotide difference between FV3 and LMo was observed. This result and the difference found in the microsatellite region allow proposing the viruses LMo and FV3 as different strains of the same species.

The results of this project highlight the need to identify other genome regions within the iridoviruses to allow for a better distinction among close strains.

Keywords: *Iridoviridae*; Antiviral activity; Cytotoxicity; Molecular characterization

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract.....	V
Lista de figuras	IX
Lista de tabelas	X
Lista de abreviaturas.....	XI
1. Introdução	1
1.1. Iridovírus	1
1.1.1. Taxonomia e estrutura da partícula viral.....	1
1.1.2. Caracterização dos isolados virais	2
1.1.3. Ciclo replicativo	3
1.1.4. Mecanismos de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro	6
1.1.5. Patologias associadas à infeção.....	6
1.1.6. Controlo da infeção	7
1.2. <i>Solidago virgaurea</i> L.	8
1.3. Objetivos deste trabalho	9
2. Materiais e métodos.....	10
2.1. Cultura de células animais.....	10
2.2. Preparação de extrato aquoso	10
2.3. Citotoxicidade	11
2.4. Vírus	11
2.4.1. Produção de vírus	12
2.4.2. Titulação de vírus	12
2.5. Ensaio de atividade antiviral.....	13
2.5.1. Titulação na presença de E6.....	13
2.5.2. Efeito virucida	14
2.5.3. Efeito no ciclo replicativo	14
2.6. Caracterização molecular	14
2.6.1. Extração de DNA viral.....	14
2.6.2. Região microssatélite	15
2.6.2.1. Otimização das condições de eletroforese.....	15
2.6.2.2. PCR e avaliação dos amplicões obtidos	15
2.6.3. Proteína de reparação de DNA putativa.....	16
2.6.4. vIF-2 α	16

3. Resultados e discussão	17
3.1. Caracterização do extrato E6.....	17
3.1.1. Análise por HPLC	17
3.1.2. Citotoxicidade	18
3.2. Otimização da produção de vírus	19
3.3. Titulação na presença de E6.....	20
3.4. Efeito virucida	21
3.5. Efeito no ciclo replicativo	22
3.6. Caracterização molecular	24
3.6.1. Região microssatélite	24
3.6.2. Proteína de reparação de DNA putativa.....	26
3.6.3. vIF-2 α	28
3.7. Conclusões.....	29
4. Referências bibliográficas	30

Lista de figuras

Figura 1.1 – Partícula viral de iridovírus	2
Figura 1.2 – Ciclo replicativo de FV3.....	3
Figura 1.3 – Fotografia de TEM de células infectadas por iridovírus	5
Figura 1.4 – Patologias em <i>Anolis carolinensis</i>	7
Figura 1.5 – Patologias em <i>Pelophylax kl. esculentus</i>	7
Figura 1.6 – <i>Solidago virgaurea</i> L.....	8
Figura 2.1 – Fotografia de MO de células Vero não-infectadas e infectadas	12
Figura 3.1 – Comparação de extratos por HPLC	17
Figura 3.2 – Resultado da viabilidade celular	18
Figura 3.3 – Resultado da otimização da produção de vírus.....	19
Figura 3.4 – Resultado da titulação na presença de E6.....	20
Figura 3.5 – Fotografia de microplaca de efeito virucida	21
Figura 3.6 – Resultado do efeito no ciclo replicativo	22
Figura 3.7 – Fotografia de microplaca de efeito no ciclo replicativo.....	22
Figura 3.8 – Resultado de efeito no ciclo replicativo para FV3.....	23
Figura 3.9 – Comparação de perfis de marcadores de massa molecular.....	24
Figura 3.10 – Exemplo de <i>output</i> do <i>Image Lab</i>	25
Figura 3.11 – Massas moleculares observadas dos vários isolados para a região microsatélite	25
Figura 3.12 – Fotografia de gel de agarose para o gene codificante para a proteína de reparação de DNA putativa	27
Figura 3.13 – Gráfico relativo à qualidade da sequenciação do gene codificante para a proteína de reparação de DNA putativa	27
Figura 3.14 – Alinhamento das sequências das amostras obtidas por sequenciação do gene codificante para a proteína de reparação de DNA putativa.....	27
Figura 3.15 – Fotografia de gel de agarose para o gene vIF-2 α	28

Lista de tabelas

Tabela I – Massas moleculares observadas e médias para a região microsatélite	26
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

ALRV – *Amphibian-like ranaviruses*.

ATCC – American Type Culture Collection.

ATP – Adenosina Trifosfato.

ASFV – *African swine fever virus*.

BHK – linha celular derivada de rim de hamster bebé (*Baby Hamster Kidney*).

CC₅₀ – Concentração citotóxica que destrói 50% das células.

CHO – linha celular derivada de ovário de hamster Chinês (*Chinese Hamster Ovary*).

CMTV – *Common midwife toad virus*.

DE – Delayed Early (genes).

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

dsDNA – DNA de cadeia dupla.

dsRNA – RNA de cadeia dupla.

ECP – Efeito Citopático.

EHNV – *Epizootic haematopoietic necrosis virus*

EMCV – *Encephalomyocarditis virus*.

EtBr – Brometo de etídio.

FBS – Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*).

FV3 – *Frog virus 3*.

GGRV – *German gecko ranavirus*.

GIV – *Grouper iridovirus*.

GSIV – *Giant salamander iridovirus*.

HBV – *Hepatitis B virus*.

HeLa – Linha celular derivadas de carcinoma cervical de Henrietta Lacks em 1951.

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*.

HSV – *Herpes simplex virus*.

IAP – *Inhibitor of Apoptosis*.

IC₅₀ – Concentração que inibe a replicação viral em 50%.

IC₉₀ – Concentração que inibe a replicação viral em 90%.

IE – Immediate Early (genes).

kbp – kilo pares de bases.

LCDV – *Lymphocystis disease virus*.

MCP – *Major Capsid Protein*.

MHC – *Major Histocompatibility Complex*.

m.o.i. – Multiplicidade de Infecção.

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.

NCLDV – *Nucleo-cytoplasmic large DNA virus*.

ORF – *Open Reading Frame*.

pb – pares de bases.

pfu – unidades formadoras de placas (*plaque-forming units*).

PKR – *Protein Kinase R*.

PBS – Phosphate-Buffered Saline.

SI – Índice de seletividade.

TAE – Tampão Tris Acetato EDTA.

TBE – Tampão Tris Borato EDTA.

TLR – Recetores *Toll-like*.

TNF – *Tumor Necrosis Factor*.

VAS – Fábricas de montagem virais.

VATT – *Virion-Associated Transcriptional Transactivator*.

vCARD – *Viral Caspase Recruitment Domains*.

vHSD – *Viral Hydroxysteroid Dehydrogenase*.

vIF-2 α – homólogo viral de eIF-2 α .

VITT – *Virion-Induced Transcriptional Transactivators*.

VLE – Very Low Endotoxin.

vTNFR – *Viral Tumor Necrosis Factor Receptor*.

1. Introdução

A biodiversidade a nível global é cada vez mais ameaçada por doenças e agentes infecciosos emergentes, problema este agravado se estes agentes forem capazes de causar rápidos declínios na população em causa. Se estes patógenos tiverem um largo espetro de hospedeiros, rapidamente pode acontecer um episódio fora de controlo e levar eventualmente à extinção de espécies (Rosa *et al.*, 2017).

Olhando por outro ponto de vista, o económico ou comercial, agentes infecciosos capazes de dizimar populações de animais comercialmente relevantes são, de igual modo ao ponto de vista conservacionista, também de extrema importância que seja feito o seu controlo, a fim de evitar grandes perdas económicas (Chinchar *et al.*, 2009).

1.1. Iridovírus

1.1.1. Taxonomia e estrutura da partícula viral

Os iridovírus pertencem à família *Iridoviridae*, que está englobada no grupo *Nucleo-cytoplasmic large DNA viruses* (NCLDV). Esta família divide-se em cinco géneros: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Megalocytivirus* e *Lymphocytivirus*. Estirpes e espécies virais dos géneros *Iridovirus* e *Chloriridovirus* infetam invertebrados como insetos ou crustáceos enquanto que as pertencentes aos géneros *Ranavirus*, *Lymphocytivirus* e *Megalocytivirus* infetam vertebrados heterotérmicos como peixes, anfíbios e répteis (Stöhr *et al.*, 2015).

As partículas virais destes vírus possuem forma icosaédrica e são de grandes dimensões relativamente às de outras famílias de vírus, podendo ir dos 120 nm aos 200 nm de diâmetro e possuem um invólucro interno localizado entre o núcleo viral (onde se encontra o genoma) e a cápside (figura 1.1). Contrariamente à maioria das famílias de vírus, o invólucro viral externo **não** é necessário para que seja possível ocorrer infeção e, assim, partículas virais sem invólucro (que são libertadas após haver lise da célula infetada) podem infetar outras células. Contudo, partículas virais com invólucro possuem maior infecciosidade (Chinchar, 2002), possivelmente devido à presença nesta estrutura de proteínas específicas para recetores celulares (Chinchar *et al.*, 2009). Não está descrito que recetores celulares estes vírus usam mas pensa-se ser um recetor muito comum em vários organismos, já que estes vírus possuem uma gama de células hospedeiras *in vitro* muito grande, desde células isoladas de mamíferos (HeLa, BHK, CHO), peixes, anfíbios ou répteis (Chinchar *et al.*, 2009). A gama de células hospedeiras *in vivo* é muito mais restrita e pensa-se que seja devido à baixa produtividade quando incubados a temperaturas superiores a 32 °C (Chinchar *et al.*, 2009).

O nome *Iridovirus* provém de Iris, deusa Grega do arco-íris e foi atribuído a estes vírus devido a um efeito iridescente observável em animais infetados, efeito que ocorre quando a carga viral presente no organismo infetado é muito elevada. Nestes casos, a infeção é frequentemente fatal (Chinchar, 2002).

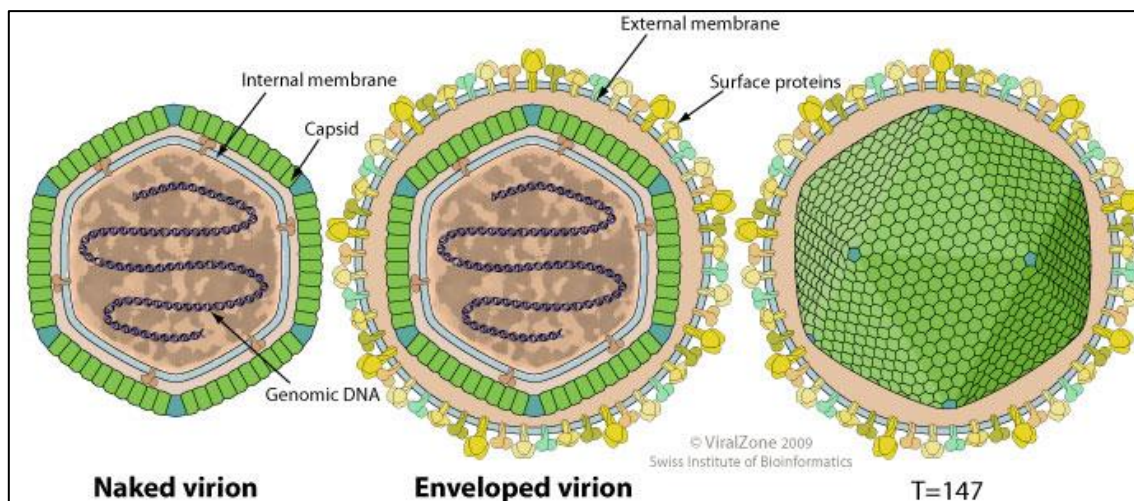


Figura 1.1 – Esquema ilustrativo de uma partícula viral de um iridovírus (ViralZone, ExPASy).

O genoma destes vírus é de DNA de cadeia dupla (dsDNA) e como tal pertencem ao Grupo I da classificação de Baltimore, podendo o tamanho variar entre 140 kpb (género *Ranavirus*) a mais de 200 kpb (género *Iridovirus*) (Chinchar *et al.*, 2009) e codifica para cerca de 100 proteínas. Tal como em alguns bacteriófagos, o genoma é circularmente permutado e com redundância terminal (Chinchar, 2002), característica única entre vírus que infetam organismos do reino animal (Chinchar *et al.*, 2009).

Os cinco géneros podem distribuem-se por dois grupos (poderão vir a ser agrupados em subfamílias aquando de uma revisão taxonómica) com base nos organismos hospedeiros que infetam e no nível de metilação do genoma. Os vírus dos géneros *Iridovirus* e *Chloriridovirus* infetam invertebrados e possuem um genoma pouco metilado enquanto que os dos géneros *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* e *Megalocytivirus* infetam vertebrados de sangue frio e possuem genomas em que aproximadamente 25% dos resíduos de citosina são metilados por uma metiltransferase de DNA viral (Chinchar *et al.*, 2009).

Neste trabalho, foi considerado apenas o género *Ranavirus*. A estirpe tipo deste género é o *Frog virus 3* (FV3), isolado de *Rana pipiens* com infeções subclínicas durante uma pesquisa sobre adenocarcinomas nos Estados Unidos da América (Granoff *et al.*, 1965) e foi demonstrado ser patogénico para formas larvares deste animal (Jerrett *et al.*, 2015).

1.1.2. Caraterização dos isolados virais

Nos últimos anos foi detetado um grande número de isolados de ranavírus em animais selvagens e em cativeiro, mas o seu estudo e caraterização provou-se insuficiente. Com o avanço das técnicas de sequenciação, cada vez mais vão surgindo genomas completamente sequenciado mas a maioria dos isolados só estão caraterizados com base em sequências parciais do gene codificante para a proteína principal da cápside (*Major Capsid Protein* – MCP), visto ter uma sequência altamente conservada mas não tendo, por isso, poder discriminativo entre estirpes diferentes (Stöhr *et al.*, 2015). Assim, existem estudos que tentam determinar regiões genómicas mais variáveis e que possam ser usadas para diferenciação dos isolados (Ariel *et al.*, 2010; Hyatt *et al.*, 2000), sendo a análise realizada por PCR com *primers* específicos para essas regiões. Estas regiões incluem a sequência completa do gene da

MCP, o gene codificante para a polimerase de DNA, os genes codificantes para subunidades de uma redutase de ribonucleósidos (*ribonucleoside diphosphate reductase alfa and beta subunit-like protein*), um gene codificante para um fator de virulência putativo (vIF-2 α), homólogo da subunidade alfa do fator de iniciação eucariota (eIF-2 α), uma região microsatélite caracterizada por ser polimórfica e com um número variável de repetições de poucos nucleótidos (Mavian *et al.*, 2012). Será ainda incluído neste trabalho um gene codificante para uma proteína de reparação de DNA putativa (Chen *et al.*, 2006; Stöhr *et al.*, 2015).

Árvores filogenéticas construídas com base num conjunto de 17 genes *core* mostra a existência de subgrupos dentro do género *Ranavirus*. Atualmente encontra-se subdividido em ALRV (*amphibian-like ranaviruses*) e GIV (*grouper iridovirus-like ranaviruses*). Por sua vez, os ALRV subdividem-se em três grupos, representando três arranjos genómicos distintos: EHNV-like, CMTV-like e FV3-like (Stöhr *et al.*, 2015). Existem isolados portugueses que não foram incluídos no estudo de Stöhr *et al.*, 2015 e que só foram parcialmente caracterizados (Soares *et al.*, 2003; Alves de Matos *et al.*, 2008; Dinis, 2012) mas resultados preliminares (MF Caeiro, comunicação pessoal) indicam que são muito próximos do *German gecko ranavirus*, incluído no grupo FV3-like referido anteriormente (GGRV, 2000/99, Stöhr *et al.*, 2015).

1.1.3. Ciclo replicativo

A grande maioria do conhecimento sobre o ciclo replicativo é baseado no que está descrito para o FV3, o que certamente é regra para membros do género *Ranavirus* mas pode não o ser para outros membros da família, como observado em outras famílias de vírus (Chinchar *et al.*, 2009).

Tal como o nome do grupo onde estão inseridos (NCLDV) indica, uma parte do ciclo replicativo dos iridovírus ocorre no núcleo da célula infetada enquanto que outra parte ocorre no citoplasma (figura 1.2) (Chinchar *et al.*, 2009).

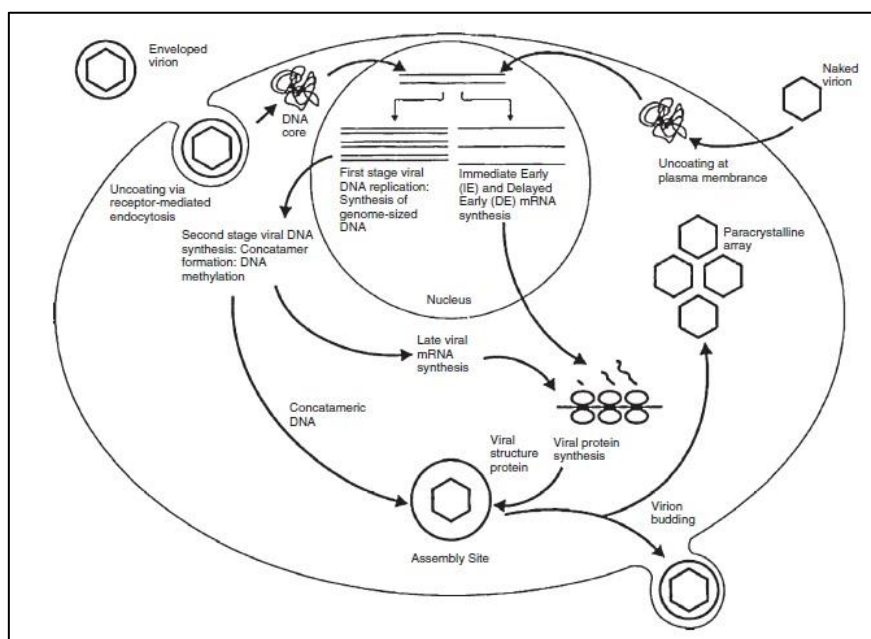


Figura 1.2 – Ciclo Replicativo de FV3 (Chinchar *et al.*, 2009).

Partículas virais com invólucro são internalizadas por endocitose mediada por recetores com envolvimento de regiões revestidas por clatrina. O invólucro é perdido no interior ácido das vesículas endocíticas e resulta na libertação do core nucleoproteico. Partículas virais sem invólucro, por outro lado, entram por fusão entre a membrana lipídica interna e a membrana celular. Pensa-se que, analogamente ao que acontece para os poliovírus (resíduos hidrofóbicos internos são externalizados, interagem com a membrana celular e formam um canal por onde o genoma é transferido para o citoplasma), a adsorção do FV3 resulta em mudanças de conformação que permitem a fusão da membrana interna com a membrana celular e permitir a entrada do core de nucleoproteína no citoplasma (Chinchar, 2002).

A expressão génica ocorre sequencialmente em cascata, começando com a expressão de genes precoces imediatos (IE – *Immediate Early*), seguindo-se a expressão de genes atrasados imediatos (DE – *Delayed Early*) e finalmente a expressão de genes tardios. Os genes IE e DE são expressos no núcleo enquanto que os genes tardios são expressos no citoplasma (Chinchar *et al.*, 2009).

A transcrição dos genes IE é feita pela polimerase de RNA Tipo II celular, usando o genoma viral inicial como molde. Para que esta transcrição ocorra com sucesso, requer também a presença de um ou mais transativadores transcripcionais associados ao virião (*Virion-Associated Transcriptional Transactivator* – VATT), ou seja, requer a presença da própria partícula viral e não apenas da molécula de DNA. Mais estudos são necessários para que este mecanismo seja perfeitamente compreendido. Após transcrição e tradução dos genes IE, uma ou mais proteínas IE são necessárias para que ocorra expressão de transcritos DE e tardios. Pensa-se que esta(s) proteína(s), referida(s) como transativadores transcripcionais induzidos pelo vírus (*Virus-Induced Transcriptional Transactivators* – VITT) são necessárias para que a transcrição destes genomas altamente metilados seja possível. Os transcritos IE codificam essencialmente para proteínas reguladoras enquanto que os transcritos DE codificam para proteínas catalíticas, como é o exemplo da polimerase de DNA viral (Chinchar *et al.*, 2009).

Após ter ocorrido a síntese da polimerase de DNA viral e sua translocação para o núcleo da célula, inicia-se a replicação do DNA nesse mesmo compartimento, que resulta na síntese de moléculas cujo tamanho pode ir de uma a duas vezes o tamanho normal do genoma. Estas moléculas de DNA viral são posteriormente transportadas para o citoplasma da célula, onde funcionam como molde para a formação de DNA concatamérico (Chinchar *et al.*, 2009).

Ao chegarem ao citoplasma, as moléculas de DNA sofrem uma metilação nos resíduos de citosina nos oligonucleótidos CpG, levada a cabo por uma metiltransferase de DNA viral. Esta modificação é importante e pensa-se que pode ter como propósito proteger o DNA viral da ação de endonucleases ou até bloquear a indução de citocinas pro-inflamatórias quando DNA viral não-metilado interage com recetores Toll-like 9 (TLR 9) (Chinchar *et al.*, 2009).

O DNA viral sofre, a seguir, uma nova etapa de síntese, em que se formam longas cadeias concataméricas, podendo chegar a mais de dez vezes o tamanho do genoma final. Uma proteína viral distinta da polimerase de DNA viral é necessária para a formação destes concatâmeros, não sendo conhecido com exatidão o seu mecanismo de ação neste processo (Chinchar *et al.*, 2009).

É também no citoplasma que ocorre a transcrição dos genes tardios, sendo isto levado a cabo por uma polimerase de RNA dependente de DNA viral ou celular modificada pelo vírus. Pensa-se que este processo ocorra nas fábricas de montagem virais (*Viral Assembly Sites* – VAS), embora mais estudos sejam necessários para confirmar o local celular exato (Chinchar *et al.*, 2009).

Pensa-se que as proteínas virais tardias tenham funções estruturais ou que sejam associadas à partícula viral. Com exceção da MCP, as outras proteínas estruturais ainda estão por desvendar. Muitas podem estar associadas à partícula viral mas não estão exatamente descritas se são proteínas encontradas na cápside ou se têm funções regulatórias ou catalíticas sobre a partícula viral (Chinchar *et al.*, 2009).

A morfogênese das partículas virais ocorre nas VAS. Quando observadas por microscopia eletrônica, as VAS aparecem como regiões transparentes, sem organelos celulares grandes e cercadas por filamentos intermediários e mitocôndrias (figura 1.3). Os filamentos intermediários têm uma função de ancoragem das VAS e exclusão de elementos celulares que possam interferir com a morfogênese viral enquanto que a presença das mitocôndrias pode indicar que haja uma elevada necessidade de ATP para que ocorra esta morfogênese viral, como acontece em outros vírus como o vírus da Hepatite B (*Hepatitis B virus* – HBV) ou o vírus da Peste suína africana (*African swine fever virus* – ASFV). É inteiramente possível a observação de cápsides vazias, cheias e em estádios intermédios, nestas estruturas (Chinchar *et al.*, 2009).

Embora não existam estudos na família *Iridoviridae*, pode-se tirar inferências sobre a formação das partículas virais analisando o processo no ASFV, já que este vírus possui uma estrutura similar à do FV3. Assim, o primeiro passo é um recrutar de cisternas de retículo endoplasmático, que dão origem a membranas virais e, posteriormente, desenvolvem-se em estruturas icosaédricas quando se dá a montagem de proteínas da cápside. O core da partícula forma-se dentro do invólucro interno, onde o DNA viral e nucleoproteínas são encapsidadas. O DNA viral é encapsidado por um mecanismo de *headful*, em que é encapsidado entre 5 a 50 % (variando de vírus para vírus) de genoma adicional, sendo este mecanismo o responsável pelo característico genoma circularmente permutado e redundância terminal encontrado nos *Iridoviridae* (Chinchar *et al.*, 2009).

Após a sua formação, as partículas virais recém-formadas ou acumulam-se em matrizes paracristalinas no citoplasma ou são transportadas para a membrana celular, onde adquirem invólucro através de gemulação. Experiências em FV3 mostram que mais de 90% das partículas virais permanecem no interior da célula infectada (Chinchar *et al.*, 2009).

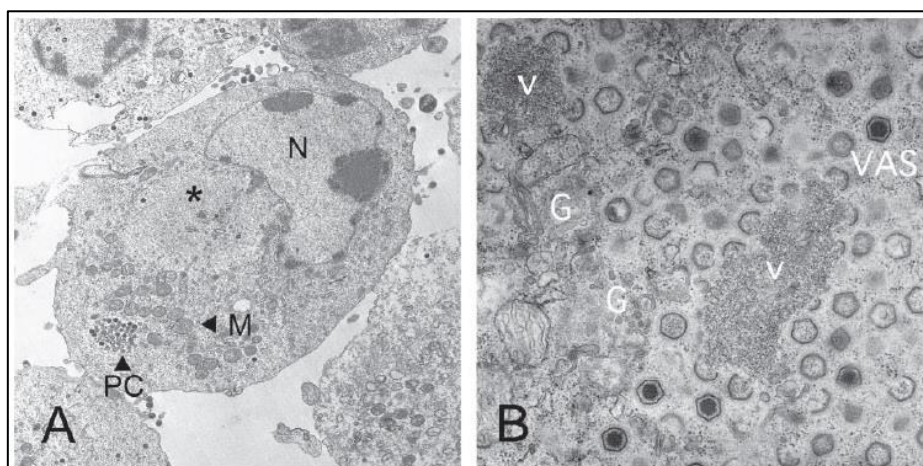


Figura 1.3 – Fotografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão de células infectadas por iridovírus. **A)** Célula de *Pimephales promelas* infectada por FV3 evidenciando cromatina condensada e marginalizada no núcleo (N), VAS (*), mitocôndrias (M) e uma matriz paracristalina com partículas virais recém-formadas (PC). **B)** Ampliação de uma VAS numa célula dérmica de *Paralichthys olivaceus* infectada por *Lymphocystis disease virus* – LCDV, evidenciando um viroplasma (V), complexos de Golgi (G) e VAS. Observa-se claramente partículas virais em vários estádios de montagem (Chinchar *et al.*, 2009).

1.1.4. Mecanismos de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro

Analogamente ao que acontece nos poxvírus e herpesvírus, certamente que os iridovírus também codificam proteínas que modulam as respostas imunológicas dos hospedeiros infectados e lhes permitam evadir das mesmas. Foram identificadas várias proteínas que têm este efeito, como vIF-2 α (homólogo viral de eIF-2 α , um fator de iniciação da tradução eucariota, que se pensa ter efeito de pseudo-substrato com o fim de prevenir a fosforilação de eIF-2 α por ligação a PKR, uma cinase ativada por dsRNA), uma vCARD (domínio de recrutamento de caspase), uma vHSD (desidrogenase de hidroxisteróides), vTNFR (recetor de fator de necrose tumoral), IAP (proteína inibidora de apoptose) e ainda outras ORFs que codificam proteínas putativas que contêm domínios similares de imunoglobulina ou MHC. Pensa-se que vCARD tenha uma ação bloqueante da ativação de respostas pro-inflamatórias e apoptóticas ou que ative uma via dependente de interações CARD-CARD. vTNFR tem uma ação bloqueante dos genes proinflamatórios, ligando-se a TNF e prevenindo, assim, sinalização através do verdadeiro recetor de TNF. Relativamente a vHSD, pensa-se que esta esteja envolvida na modulação da biossíntese de esteróides e, assim, debilitar a imunidade em infeções *in vivo*, algo similar ao que acontece com o homólogo encontrado no vírus *Vaccinia*. Curiosamente, sobre-expressão de vHSD em ranavírus tem um efeito supressor do efeito citopático, indicando que possivelmente esteja envolvido não só em infeções *in vivo* como também em infeções *in vitro* (Chinchar *et al.*, 2009).

1.1.5. Patologias associadas à infeção

Infeções por iridovírus podem não causar quaisquer sinais clínicos (Alves de Matos *et al.*, 2011) ou causar episódios de mortalidade em massa numa população de animais (Alves de Matos *et al.*, 2008). Sinais clínicos gerais incluem letargia e anorexia. Estão descritos sinais clínicos no trato respiratório superior, tais como corrimento nasal, conjuntivite, estomatite necrotico-difteróide e edema cervical subcutâneo. Também estão descritas manifestações de hepatite, enterite e pneumonia. A transmissão entre animais pode ocorrer por meios diretos ou indiretos. Nos meios diretos, pode-se incluir a ingestão, o canibalismo ou o contato com outros animais moribundos ou já mortos. Meios indiretos de infeção podem ser através de água, sedimentos ou solos previamente contaminados com partículas virais (Nazir *et al.*, 2012)

Num caso clínico registado, em *Chondropython viridis*, os animais apresentavam úlceras na mucosa nasal, necrose hepática e uma inflamação necrosante severa da submucosa faríngea. Noutro caso registado, em *Uroplatus fimbriatus*, o animal morreu com glossite ulcerativo-necrozante e necrose focal hepática. Ainda noutro caso registado, em *Japalura splendida*, os animais apresentavam inflamação granulomatosa e necrosante da pele, tubulonefrose, hiperémia e necrose hepática. Como já foi dito anteriormente, existe pelo menos um caso registado em que não se observou quaisquer sinais clínicos decorrentes da infeção, o caso observado em *Iberolacerta monticola* (Stöhr *et al.*, 2013 A). Outros exemplos de lesões podem ser observados nas figuras 1.4 e 1.5.



Figura 1.4 – Alterações a nível da pele em *Anolis carolinensis* infetados com iridovírus. **A)** Descoloração bege-cinzenta no abdómen lateral; **B)** Múltiplas úlceras na face abdominal ventral; **C)** Lesões acinzentadas na pele da cauda (Stöhr AC *et al.*, 2013 A).

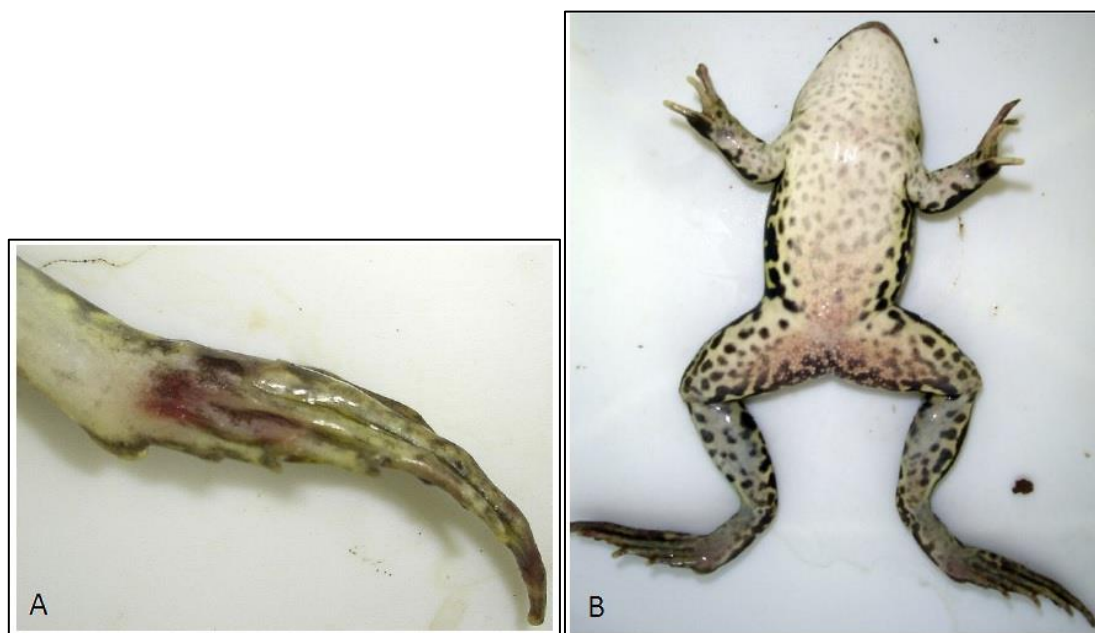


Figura 1.5 – Lesões decorrentes em *Pelophylax kl. esculentus* infetada com Iridovirus. **A)** Úlceras hemorrágicas nos dígitos e articulações; **B)** Hemorragia petequial ventral no abdómen inferior e coxas superiores (Stöhr AC *et al.*, 2013 B).

1.1.6. Controlo da infeção

Como estes vírus representam uma severa ameaça à economia das aquaculturas e dada a resiliência das partículas virais, seria de todo o interesse poder combater as suas infeções. Apenas recentemente, dois fármacos (ribavirina e hidroclorato de moroxidina) com efeito antiviral bem conhecido para um largo espetro de vírus com genoma quer de DNA quer de RNA, mostraram efeito antiviral em células infetadas com um ranavírus (*Giant salamander iridovirus* - GSIV) (Yu *et al.*, 2016). Esse efeito manifestou-se na inibição de produção de vírus em células infetadas após tratamento, associada à

inibição de apoptose e de manifestação de efeito citopático, ambas associadas às infeções por iridovírus.

Dada a escassez de antivirais para o combate às infeções por estes vírus, um excelente ponto de partida poderão ser produtos naturais obtidos da flora portuguesa, flora esta muito rica e diversificada em número de espécies devido às características geográficas onde o país está envolvido (tal como a latitude, exposição solar, natureza do solo, proximidade do mar, entre outros) (Santos, 2013).

Considerando que um extrato aquoso de caules e folhas de *Solidago virgaurea* L. apresentou atividade antiviral para membros das famílias *Herpesviridae* (Resende, 2012; Barra, 2014; Mendes, 2015) e *Picornaviridae* (Santos, 2013) decidiu-se averiguar a sua potencialidade relativamente aos iridovírus.

1.2. *Solidago virgaurea* L.

O género *Solidago*, família Asteraceae, possui cerca de 130 espécies de plantas herbáceas e perenes. Ocorre em todo o mundo com exceção da Antártida e pode ser encontrada selvagem ou ser cultivada para fins de ornamentação (Abdel Motaal *et al.*, 2016). Em termos medicinais, está descrito que estas plantas possuem atividade diurética, clorética, antissética, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante (Wang *et al.*, 2017).

S. virgaurea (figura 1.6) é usada tradicionalmente como anti-inflamatório, no tratamento de vários sintomas como cistite e ainda no tratamento de inflamações da boca e garganta. As estruturas mais utilizadas são os ramos apicais, sendo estes utilizados desde a Idade Média no tratamento de doenças do trato urinário, nefrolitíase e próstata (Abdel Motaal *et al.*, 2016; Mendes, 2015). Como referido anteriormente, mais recentemente foi demonstrado o seu efeito antiviral *in vitro*, para dois *Herpesviridae* (HSV1 e HSV2) (Barra, 2014; Mendes, 2015) e um *Picornaviridae* (vírus da Encefalomiocardite murina – EMCV) (Santos, 2013).



Figura 1.6 – *Solidago virgaurea* L., família Asteraceae (Fotografia pessoal).

1.3. Objetivos deste trabalho

Como foi dito anteriormente, infecções por iridovírus têm consequência graves perdas económicas em aquaculturas, com elevadas taxas de mortalidade nessas populações de peixes. Também em populações de anfíbios e répteis, as taxas de mortalidade são elevadas quando ocorrem surtos, pondo em risco espécies ecologicamente mais vulneráveis. Por estas razões é de primordial importância que sejam encontrados produtos com atividade contra os iridovírus.

Assim, um dos objetivos deste trabalho foi a avaliação do efeito antiviral do extrato aquoso de caules e folhas de *S. virgaurea* referido anteriormente contra os iridovirus. Analisou-se a sua capacidade de inativar partículas virais (efeito virucida) e o seu efeito na replicação viral quando células infetadas são incubadas com concentrações não-citotóxicas de extrato (efeito no ciclo replicativo).

Este trabalho teve como segundo objetivo contribuir para a caracterização dos isolados portugueses de ranavírus existentes no laboratório. Optou-se por avaliar: i) o número de nucleótidos existente numa região microssatélite descrita para este género (Mavian *et al.*, 2012), ii) a existência ou não de uma deleção no gene codificante para o fator de virulência putativo vIF-2 α (Essbauer *et al.*, 2001; Stöhr *et al.*, 2015), iii) a sequência nucleotídica de um gene codificante para uma proteína de reparação de DNA putativa existente nos ranavírus (Chen *et al.*, 2006; Stöhr *et al.*, 2015)

2. Materiais e métodos

Dada a natureza do material biológico e meios de cultura envolvidos, todos os ensaios que envolveram o manuseamento de células e de vírus, foram realizados numa câmara de fluxo laminar classe II-A, em condições de esterilidade.

2.1. Cultura de células animais

Utilizou-se as linhas celulares Vero e Vero E6 durante a execução de todos os ensaios que tenham envolvido culturas de células animais. É uma linha contínua, aneuploide, fibroblástica e de crescimento em monocamada, com o potencial de crescer indefinidamente em cultura (Sheets, 2000). A linha celular Vero foi originalmente isolada a partir de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) a 27 de Março de 1962 por Y. Yasumura e Y. Kawakita na Universidade de Chiba, Japão. Em 1966, na 93ª passagem, foi depositada na coleção de culturas ATCC e, desde então, é muito utilizada em estudos de virologia por todo o mundo. A linha celular Vero E6 é um clone da linha Vero (Ammerman, 2008).

As células foram subcultivadas em frascos de cultura T75 e T25 (75 cm² e 25 cm² de área útil, respetivamente) utilizando os meios de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) ou CO₂-independente (Gibco) tendo adicional suplementação com L-glutamina ou GlutaMAX™ (Gibco) a 5 µg/mL, sulfato de gentamicina (Biochrom) a 0,005%, e Soro Fetal Bovino (FBS, Biochrom) a 10%. As células foram crescidas em estufa a 37 °C com ambiente húmido e, no caso de DMEM, em ambiente com 5% CO₂ a fim de equilibrar e manter o pH apropriado deste meio de cultura.

Após invasão do frasco, as células foram sub-cultivadas para novos frascos ou microplacas. Removeu-se o meio de cultura pré-existente no frasco e lavou-se a monocamada de células com 2,5 mL de tampão Phosphate-Buffered Saline (PBS) duas vezes. De seguida, adicionou-se 1 mL de tripsina ou TrypLE™ Express (Gibco) e incubou-se 5 min a 37 °C, com ocasional agitação. Adicionou-se 5 mL de meio de cultura suplementado com FBS a 10% com o objetivo de inativar a tripsina e de ressuspender as células. Após homogeneização, distribuíram-se as células a fim de manter a cultura ou de servir de suporte para ensaios experimentais. Utilizou-se os volumes descritos em frascos T75, tendo sido utilizado um terço dos mesmos para frascos T25.

2.2. Preparação do extrato aquoso

Durante este trabalho, foi utilizado o extrato aquoso de caules e folhas de *S. virgaurea*, família Asteraceae, designado como extrato E6. Após colheita de espécimes vegetais no campo (localização: 38° 14' 01''N 8° 44' 02''W), separou-se as flores dos caules e folhas que se cortaram em peças com cerca de 2 cm, e preparou-se uma suspensão a 1 g/10 mL em água destilada. Ferveu-se durante 10 min, e depois de arrefecer coou-se num passador de rede fina e de seguida filtrou-se por papel Whatman nº 1. Finalmente, a solução filtrada foi sujeita ao processo de liofilização, executado pelo grupo de investigação liderado pela Prof. Dr. Luísa Serralheiro do Departamento de Química e Bioquímica (DQB) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e posteriormente

congelada a -20 °C. A partir do liofilizado, preparou-se um stock de concentração 10 mg/mL em água destilada que foi posteriormente filtrado por um poro de 0,2 µm (Sterile Syringe Filter 0.2 µm PES, VWR), aliquotado em microtubos, conservado a -20 °C, tendo uma alíquota sido mantida a 4 °C como solução a uso.

O extrato foi ainda sujeito a análise por *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) para averiguar as diferenças e semelhanças em compostos maioritários relativamente ao extrato da mesma planta preparado anteriormente e em uso no laboratório. As leituras foram realizadas a cada 1,6s (0,625 Hz) durante 30 min e a comprimentos de onda (λ) entre 200 nm e 500 nm.

2.3. Citotoxicidade

A fim de determinar a citotoxicidade do extrato aquoso recorreu-se a um ensaio colorimétrico quantitativo usando o sal tetrazólio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Este ensaio é de rápida execução e permite que seja analisado um grande número de amostras. Baseia-se no princípio que os sais de tetrazólio são reduzidos a cristais de formazan coloridos por desidrogenases presentes apenas nas mitocôndrias ativas das células. Como tal, permite discriminar entre células viáveis e inviáveis (Mosmann, 1983).

Subcultivaram-se células para microplaca de 96 poços (P96) e incubou-se a 37 °C com meio de cultura com FBS 10% até ser atingida a sub-confluência da cultura. De seguida, removeu-se o meio de cultura pré-existente e adicionou-se 100 µL/poço de meio de cultura com FBS 2% e com várias concentrações de extrato aquoso. Designaram-se poços da placa como controlos negativos, aos quais foi adicionado apenas meio de cultura com FBS 2%. Incubou-se a 37 °C durante 24h ou 48h. Finda esta incubação, retirou-se o meio de cultura com FBS 2% com ou sem extrato e adicionou-se 100 µL/poço de solução de MTT (Sigma) a 0,5 mg/mL em meio de cultura com FBS 2%. Incubou-se a 37 °C durante 2 h. De seguida, removeu-se cuidadosamente a solução de MTT, de cada poço da microplaca e adicionou-se 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan. Incubou-se a 25 °C durante 30 min, com agitação e de seguida efetuou-se leitura das microplacas por espectrofotometria em leitor de microplacas (Tecan) a $\lambda = 570$ nm e $\lambda = 630$ nm como filtro de referência.

Obteve-se o parâmetro *standard* de citotoxicidade Concentração citotóxica que reduz para 50% a viabilidade celular (CC₅₀) por comparação dos valores de absorvância obtidos entre células sob o efeito de extrato e células controlo (com 100% de viabilidade).

2.4. Vírus

Os vírus utilizados neste trabalho foram isolados dos seguintes animais: *Lissotriton boscai* (**BoA**, Alves de Matos *et al.*, 2008), *Triturus marmoratus* (**Ma3A**, **Ma3B**, **MaP3**, Alves de Matos *et al.*, 2008), *Uroplatus fimbriatus* (**2000/99**, Marschang *et al.*, 2005), *Iberolacerta monticola* (**LMo**, Alves de Matos *et al.*, 2011) e a estirpe tipo dos ranavírus, o *Frog Virus 3* (**FV3**, Granoff, 1965). Os vírus foram mantidos em suspensão no meio de cultura em que foram produzidos, a 4 °C.

2.4.1. Produção de vírus

As suspensões virais foram produzidas em frascos T75 ou T25 contendo culturas celulares sub-confluentes. Removeu-se o meio de cultura pré-existente e adicionou-se 2 mL ou 0,5 mL de meio com FBS a 2% incluindo um volume de suspensão viral apropriado de forma a se obter uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,01. Procedeu-se a uma incubação a 37 °C durante 20 min para que as partículas virais possam adsorver aos recetores celulares. De seguida, adicionou-se 12 mL ou 4 mL (T75 e T25, respetivamente) de meio de cultura suplementado com FBS a 2% e incubou-se o frasco a 30 °C até se observar microscopicamente um efeito citopático (ECP) avançado ou total (figura 2.1) na cultura (normalmente 3 a 5 dias após a infecção). Posteriormente, colheu-se as suspensões virais para tubos Falcon e centrifugou-se durante 5 min a 3000 g. Recolheu-se o sobrenadante para novo tubo Falcon (Vírus extracelular). Adicionou-se PBS (1/10 do volume do vírus extracelular) ao sedimento e células existente no tubo original e fez-se ciclos de congelação e descongelação com objetivo de lisar as células, por choque térmico, alternando entre -80 °C (congelação) e 37 °C (descongelação). Finalmente, centrifugou-se durante 5 min a 3000g e colheu-se o sobrenadante para microtubo de 1,5 mL (Vírus intracelular).

Todas as suspensões virais foram mantidas a 4 °C.

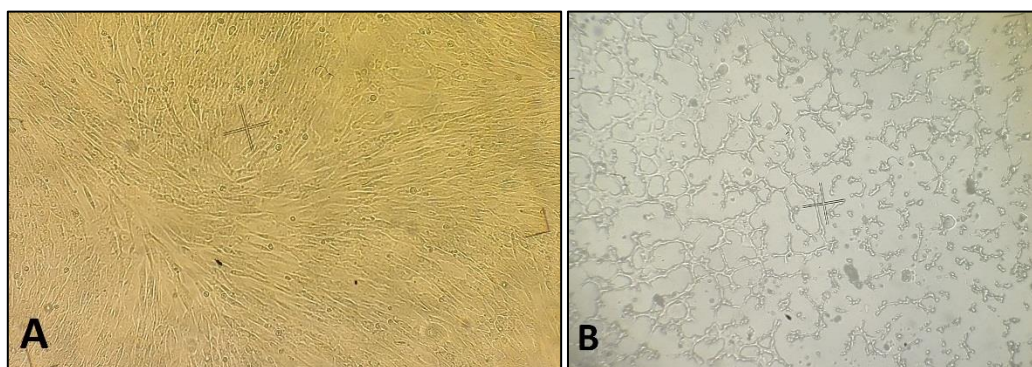


Figura 2.1 – Observação microscópica de células Vero não-infetadas (A) e células Vero infetadas com ECP avançado (B). Em B observam-se grandes zonas de lise na monocamada celular devido à infecção viral. Ampliação total = 100x

Procurou-se otimizar a eficiência da produção destes vírus fazendo produções em diferentes meios de cultura suplementados com soro a 2%: DMEM Low Glucose (1 g/L) (Gibco), DMEM High Glucose (4,5 g/L) (Biochrom), Very Low Endotoxin (VLE) DMEM (Biochrom) e meio CO₂-Independente (Gibco); utilizou-se ainda Advanced DMEM (Gibco) sem suplementação de FBS. Após a produção, titulou-se cada suspensão viral produzida com o objetivo de comparar os títulos obtidos.

2.4.2. Titulação de vírus

O título em unidades formadoras de placas por mL (pfu/mL) das suspensões virais corresponde ao número de partículas virais infecciosas presentes na suspensão. Obtém-se por contagem de zonas (placas) de lise celular decorrentes da infecção.

Diluiu-se, seriadamente a 1:10, a suspensão viral em meio de cultura com FBS 2%. Após remoção do meio de cultura pré-existente numa microplaca de 24 ou de 48 poços (P24 e P48, respetivamente), adicionou-se 0,1 mL ou 0,05 mL (P24 ou P48, respetivamente) das diferentes diluições da suspensão viral a cada poço da microplaca. Incubou-se a 37 °C durante 30 min e com agitação a cada 10 min, a fim de as partículas virais adsorverem aos recetores celulares. De seguida, adicionou-se 0,5 mL de meio de cultura com FBS 2% com Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemicals) a 2%, denominado por “Meio de titulação”. Incubou-se a microplaca a 30 °C durante 6 dias, com o cuidado de a manter completamente imóvel durante o decorrer da incubação.

Finda a incubação, adicionou-se 0,5 mL de formaldeído a 10% (v/v) a cada poço da microplaca e incubou-se a 25 °C durante 30 min, com agitação. De seguida, removeu-se o formaldeído para recipiente apropriado, lavou-se a placa com água corrente e corou-se cada poço da microplaca com 0,2 mL de violeta cristal a 0,1%, a 25 °C durante 15 min, com agitação. Finalmente, descartou-se o corante, lavou-se a placa com água corrente e secou-se ao ar ou em estufa.

O cálculo do título viral foi obtido contando as placas virais formadas e é dado pela expressão (1):

$$T = \frac{nf}{i} \quad (1)$$

Em (1), **n** corresponde à soma do número de placas virais contadas nos poços com número contável, **f** é o fator relativo à menor diluição que contribuiu para o valor de **n** e **i** é a soma dos volumes (mL) dos inóculos virais aplicados nos poços em que se contaram placas.

2.5. Ensaios de atividade antiviral

2.5.1. Titulação na presença de E6

A fim de se verificar a existência de algum potencial efeito antiviral (*screening* global) do extrato aquoso a analisar, recorreu-se ao ensaio de titulação do vírus em estudo na presença desse extrato.

Removeu-se o meio de cultura pré-existente numa microplaca P24 e adicionou-se 0,1 mL (0,05 mL em P48) da/s diluição/diluições apropriadas de suspensão viral (diluições realizadas em meio de cultura com FBS 2%). Incubou-se a 37 °C durante 30 min para que ocorresse a adsorção viral. Diluiu-se extrato em meio de titulação para concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL e, findo o período de adsorção viral, adicionou-se 0,4 mL (0,2 mL em P48) a cada poço da microplaca (aos poços designados como controlos negativos adicionou-se apenas meio de titulação sem extrato). Incubou-se a 30 °C durante 6 dias, com o cuidado de manter a microplaca completamente imóvel durante o decorrer da incubação.

Finda a incubação, procedeu-se como descrito anteriormente para a titulação viral (2.4.2.).

2.5.2. Efeito virucida

O efeito virucida de uma substância é a capacidade que a mesma tem de inativar partículas virais. Para se avaliar a existência deste efeito, incubou-se 150 µL da mesma suspensão viral (correspondendo a 10^5 pfu) sem extrato (controle) e com o extrato aquoso a 50 µg/mL, 100 µg/mL e 150 µg/mL, em microtubos de 1,5 mL, a 25 °C durante 90 min, com agitação. Após a incubação, titulou-se as quatro suspensões virais (três tratadas e uma não-tratada) como descrito anteriormente (2.4.2.).

2.5.3. Efeito no ciclo replicativo

O ensaio de efeito no ciclo replicativo, também denominado por produção na presença, é um ensaio que permite avaliar o efeito antiviral da substância durante um único ciclo replicativo.

Removeu-se o meio de cultura com FBS 10% pré-existente em poços de P24 e inoculou-se com 0,1 mL de suspensão viral (idealmente uma multiplicidade de infecção de 4 ou 5 pfu/célula). Incubou-se a 4 °C durante 1h, com agitação, de forma a sincronizar a entrada das partículas virais nas células hospedeiras. De seguida, aspirou-se o inóculo e adicionou-se 0,5 mL de meio de cultura com FBS 2% pré-aquecido a 30 °C contendo extrato aquoso diluído para as concentrações 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Aos poços correspondentes aos controles, adicionou-se apenas meio de cultura com FBS 2%. Incubou-se a 30 °C durante 24h. Após a incubação, colheu-se as suspensões virais, centrifugou-se durante 5 min a 3000 g e colheu-se o vírus extracelular. Nalgumas experiências, colheu-se a suspensão viral, e em seguida fez-se ciclos de congelamento e descongelamento com objetivo de lisar as células em suspensão, alternando entre -80 °C (congelamento) e 37 °C (descongelamento). Centrifugou-se durante 5 min a 3000g. O sobrenadante desta suspensão designa-se por Vírus total (intracelular + extracelular).

Por fim, titulou-se os vírus como descrito anteriormente (2.4.2.).

Calculou-se as concentrações de extrato que inibem a replicação viral em 50% e em 90% (IC_{50} e IC_{90} , respetivamente).

2.6. Caracterização molecular

A fim de tentar fazer diferenciação entre os isolados virais em estudo, recorreu-se à análise de três regiões descritas para o genoma dos *Ranavirus*: região microssatélite, um gene codificante para uma proteína de reparação de DNA putativa e um gene codificante para um fator de virulência putativo (vIF-2α), homólogo do fator de iniciação eucariota eIF-2α. Estas análises implicam a extração de DNA viral e a sua amplificação por PCR com *primers* específicos para cada uma dessas regiões.

2.6.1. Extração de DNA viral

O DNA viral foi extraído a partir de vírus concentrado. Para a concentração, centrifugou-se 1,4 mL de suspensão viral com um título $> 10^7$ pfu/mL, em microtubo durante 4h, a 18000 g e a 12 °C. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 180 µL de PBS e deixou-se ressuspender o sedimento a 4 °C *overnight* e conservou-se a -20 °C.

Extraíu-se o DNA do vírus concentrado utilizando o protocolo do *kit* JETQUICK Blood & Cell Culture DNA Spin Kit (Genomed), seguindo as instruções do fabricante, eluindo-se o DNA em 200 µL de água ultrapura DNase/RNase-Free.

2.6.2. Região microssatélite

Procurou-se diferenciar vários isolados de *Triturus marmoratus* (Ma3A, Ma3B, MaP3) e o isolado de *Lissotriton boscai* (BoA) do isolado de *Uroplatus fimbriatus* (2000/99). De igual forma, procurou-se diferenciar o isolado *Frog Virus 3* (FV3) do isolado de *Iberolacerta monticola* (LMO).

2.6.2.1. Otimização das condições de eletroforese

Dada a pequena dimensão dos amplicões obtidos para esta região (<100 pb), houve necessidade de otimizar as condições de eletroforese em que estes iriam ser analisados.

Preparou-se geis de agarose com Agarose Electrophoresis Grade (Invitrogen) e agarose XS-LM (GRiSP Research Solutions) a 2%, 3%, 4% e 5% (p/v) em várias combinações com tampão de corrida Tris Acetato EDTA (TAE), Tris Borato EDTA (TBE) e SGTB (GRiSP Research Solutions), corados com brometo de etídio (EtBr) a 0,005%. Avaliou-se o perfil de separação de bandas correndo 2 µL dos marcadores de massa molecular GRS Low Range (GRiSP Research Solutions) e 25 bp DNA Ladder (Invitrogen) a 250 ng/µL, nas várias combinações de geis e tampões de corrida. Correu-se os geis preparados em TBE sob uma voltagem de 100 V e os geis preparados em SGTB sob uma voltagem de 200 V. O tempo de corrida depende da estabilidade da corrente elétrica (mA), cuja intensidade pode variar ao longo da corrida, mas nunca foi inferior a 90 min. A visualização das bandas foi feita em transiluminador de luz ultravioleta (UV) a 320 nm.

De acordo com as instruções do fabricante, o tampão SGTB suporta uma voltagem máxima de 300 V sem que seja gerado calor excessivo durante a corrida, que se traduz em corridas mais rápidas. Também permite ao utilizador poupar 25% de agarose, relativamente aos tampões TAE ou TBE, para a mesma resolução.

2.6.2.2. PCR e avaliação dos amplicões obtidos

Realizou-se a amplificação da região microssatélite por PCR adicionando 1 µL de DNA a 4 µL de uma mistura de reação preparada num volume adequado a distribuir pelo conjunto de reações de PCR a realizar, de forma a que cada uma delas seja constituída por 2,5 µL de MyTaq™ Red Mix 2X (Bioline), 0,25 µL de cada *primer* e 1 µL de água ultrapura DNase/RNase-free. Utilizou-se o seguinte programa no termociclador: desnaturação inicial durante 3 min a 95 °C; 35 ciclos de desnaturação durante 15s a 95 °C, ligação durante 15s a 55 °C e extensão durante 10s a 72 °C. A extensão final foi durante 5 min a 72 °C.

Após a reação de PCR, aplicou-se a amostra de DNA amplificado em gel de agarose (Agarose Electrophoresis Grade, Invitrogen) a 4% em SGTB 1X. Para fidelizar a quantificação das bandas obtidas, observou-se e fotografou-se o gel no GelDoc (Bio-Rad Laboratories) e as fotografias obtidas

foram analisadas no *software* Image Lab (Version 5.2.1 build 11 Copyright © 2014 Bio-Rad Laboratories), com o intuito de avaliar as massas moleculares dos diferentes produtos de PCR.

2.6.3. Proteína de reparação de DNA putativa

Desenharam-se *primers* específicos para o gene da proteína de reparação de DNA putativa, alinhando as sequências depositadas no Genbank para FV3 (GB: NC005946.1) e 2000/99 (GB: KP266742.1) com auxílio do *software* online Primer 3. Amplificou-se amostras de DNA de BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 e LMo adicionando 2 µL de DNA a 13 µL de mistura de PCR contendo My Taq™ Red Mix 2X (Bioline), os dois *primers* e água ultrapura DNase/RNase-free, nas proporções referidas anteriormente (2.6.2.2.). Utilizou-se o seguinte programa no termociclador: desnaturação inicial durante 3 min a 95 °C; 29 ciclos de desnaturação durante 15s a 95 °C, ligação durante 15s a 52 °C e extensão durante 15s a 72 °C. A extensão final foi durante 5 min a 72 °C.

Após a reação de PCR, aplicou-se 2,5 µL de cada amostra de DNA amplificado em gel de agarose a 0,8% em TBE corado com EtBr a 0,005% (v/v).

De seguida, utilizou-se o *kit* DNA CLEAN & CONCENTRATOR™ (Zymo Research) para purificação dos restantes 12,5 µL de cada produto de PCR, de acordo com as instruções do fabricante mas utilizando 30 µL (10 µL + 20 µL) de água ultrapura DNase/RNase-Free no passo de eluição. As amostras foram subsequentemente sequenciadas nas duas direções pelo método de Sanger na firma Stab Vida com os mesmos *primers* utilizados na amplificação. Os cromatogramas foram analisados com *software* BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.2.6.1, Copyright © 1997-2017 Tom Hall).

2.6.4. vIF-2α

Foi analisado o gene codificante para o fator de virulência putativo vIF-2α (Stöhr *et al.*, 2015; Essbauer *et al.*, 2001).

Neste ensaio, analisou-se amostras de DNA dos isolados BoA, MaP3, Ma3B, Ma3A, 2000/99, FV3, LMo (duas amostras), HSV-1 e HSV-2.

Realizou-se a amplificação por PCR adicionando 1 µL de DNA a 4 µL de mistura de reação preparada como referido anteriormente (2.6.2.2.). Utilizou-se o seguinte programa no termociclador: desnaturação inicial durante 3 min a 95 °C; 35 ciclos de desnaturação durante 15s a 95 °C, ligação durante 15s a 55 °C e extensão durante 30s a 72 °C. A extensão final foi durante 5 min a 72 °C.

Após a reação de PCR, visualizaram-se as amostras de DNA amplificado em gel de agarose 0,75% corado com EtBr a 0,005%.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização do extrato E6

3.1.1. Análise por HPLC

Da análise por HPLC resultaram cromatogramas de absorvância registada ao longo de 30 min. De entre as análises realizadas, salienta-se a comparação entre uma solução de trabalho de um extrato E6 preparada 5 meses antes da leitura (designado por extrato **antigo**) e uma solução de trabalho de um extrato E6 preparada apenas duas semanas antes da leitura (designado por extrato **novo**) (figura 3.1).



Figura 3.1 – Comparação entre E6 preparado 5 meses antes da análise por HPLC (**antigo**) e E6 preparado duas semanas antes da análise por HPLC (**novo**). O gráfico é dado por absorvância registada ao longo de 30 min.

O tempo de utilização de uma solução de trabalho mantida a 4 °C é um fator de extrema importância, evidenciado pela análise de HPLC (figura 3.1). Embora a citotoxicidade se comporte de forma semelhante e o perfil geral seja também semelhante, observa-se um pico de absorvância muito elevado com um tempo de retenção de 2,6 min na solução de trabalho do extrato **antigo** relativamente à do extrato **novo**, onde este pico não figura. Este pico corresponde certamente a um produto de degradação resultante da contínua oxidação por entrar em contato com o ar. Uma forma de contornar este problema é alíquotar as soluções de trabalho em pequenos volumes.

3.1.2. Citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada com o ensaio MTT comparando as absorvâncias entre células tratadas com diferentes concentrações de E6 em meio de cultura com FBS 2% e células controlo não-tratadas. A linha celular utilizada foi Vero E6 e mediu-se esta viabilidade em culturas com dois níveis de confluência celular no momento de adição do extrato (início do ensaio): maior confluência que corresponde a cerca de 10^5 células/poço e menor confluência que corresponde a cerca de 5×10^4 células/poço (figura 3.2). Os valores de CC_{50} e a MNCC foram determinados por regressão linear da curva de dose-resposta e expressos sobre a forma de percentagem relativamente ao controlo.

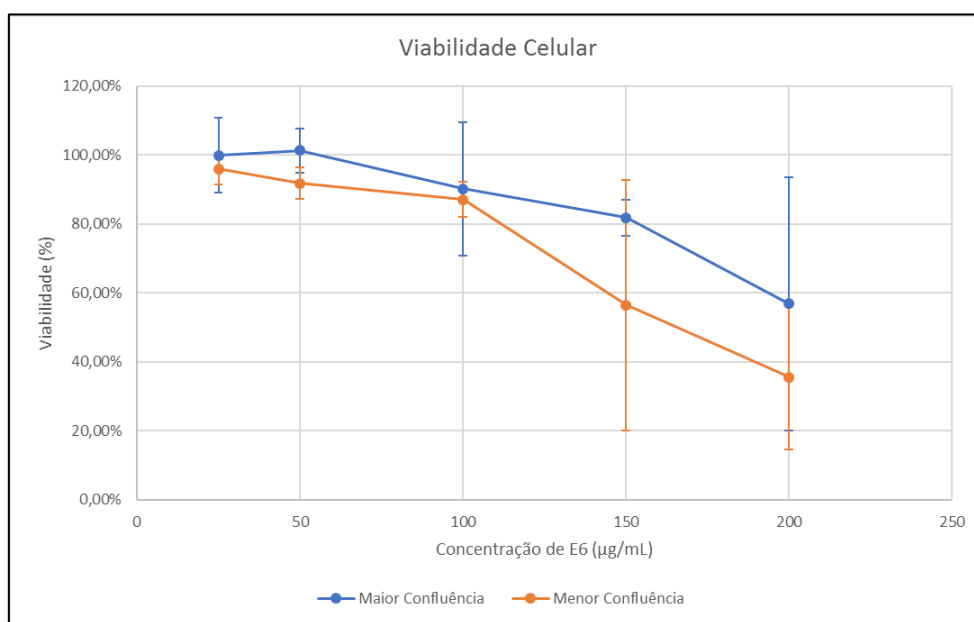


Figura 3.2 – Viabilidade de culturas celulares Vero E6 com **maior** e **menor** grau de confluência sob ação do extrato E6 durante 24h. Os valores referem-se à percentagem de viabilidade para as concentrações de 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL. As barras de erro representam o desvio padrão calculado com base em duas experiências independentes.

Com **maior** grau de confluência, verificou-se viabilidades celulares de 56,8%, 81,8%, 90,9%, 101,3% e 99,9% para concentrações de E6 de 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL, respetivamente. A CC_{50} do E6 é de 255,3 µg/mL.

Com **menor** grau de confluência, verificou-se viabilidades celulares de 31,5%, 56,5%, 87,1%, 91,8% e 96% para concentrações de E6 de 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL, respetivamente. A CC_{50} de E6 é de 172,8 µg/mL.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em células com dois níveis distintos de confluência para tentar perceber se a condição experimental usada nos ensaios com vírus, a de **menor** confluência celular, poderia resultar em maior ou menor suscetibilidade à presença do extrato. De um modo geral, a viabilidade celular é maior em situações de **maior** confluência celular (figura 3.2). Salienta-se a concentração de 100 µg/mL, em que as viabilidades observadas são muito próximas em ambos os casos (90,9% em maior confluência e 87,1% em menor confluência), e por isso selecionada para os diferentes tipos de ensaio de efeito antiviral. Experiências anteriores mostram que a concentração de

FBS é também um fator que influencia a citotoxicidade, sendo as células mais suscetíveis ao extrato em meio de cultura com menor concentração de FBS, tal como foi utilizado ao longo deste trabalho (Mendes, 2015). Estes valores de citotoxicidade observados são idênticos aos obtidos anteriormente com outros lotes de extrato E6 (Mendes, 2015).

3.2. Otimização da produção de vírus

A obtenção de vírus com um título aceitável para as experiências a realizar ($> 10^7$ pfu/mL) foi uma necessidade para a realização dos ensaios de efeito no ciclo replicativo já que só assim foi possível realizar infecções com alta m.o.i. Assim, dada a grande variedade de meios de cultura para células animais existente no mercado e para determinar o meio de cultura ideal para a produção destes vírus, testou-se meios existentes no laboratório com os isolados LMo, BoA e Ma3B. As produções foram avaliadas por comparação de títulos de vírus total (figura 3.3).

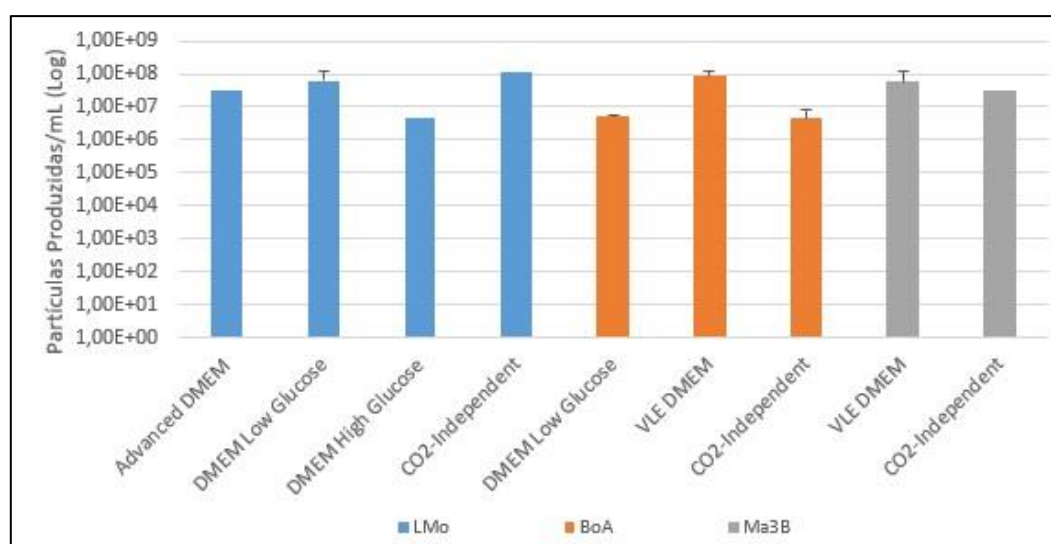


Figura 3.3 – Título do total de partículas virais produzidas nos vários meios de cultura para os isolados LMo, BoA e Ma3B. As barras de erro representam o desvio padrão calculado com base em duas experiências independentes, onde possível, tendo os restantes resultados sido obtidos com base em uma experiência.

No caso de LMo, o meio CO₂-Independente mostrou ser o mais favorável para a sua produção, tendo-se obtido $1,1 \times 10^8$ pfu/mL, mas tendo, porém, uma eficiência consideravelmente menor em DMEM High Glucose, com $4,9 \times 10^6$ pfu/mL. Com este vírus, não foi ensaiado o VLE DMEM. O meio CO₂-Independente é um meio muito prático na sua utilização porque, tal como o nome indica, não requer tamponamento em atmosfera de CO₂ como é o caso dos meios de cultura de células animais tradicionais.

Relativamente aos outros isolados, o VLE DMEM é o mais favorável para a produção destes vírus. Obteve-se $8,9 \times 10^7$ pfu/mL em BoA e $5,9 \times 10^7$ pfu/mL em Ma3B. Este meio de cultura é preparado pelo fabricante com especial atenção à quantidade de endotoxinas presentes. As endotoxinas podem ter vários efeitos adversos em culturas de células *in vitro*, de que se destacam alterações ao nível do crescimento, diferenciação e produção proteica (Ryan, 2008), sendo o último uma possível causa de

produções virais de menor título, não desvalorizando os outros efeitos que também reduzem o *fitness* celular. Sem endotoxinas, foi possível obter uma eficiência máxima nas produções dos vírus.

Resultados preliminares com FV3 mostram que o Advanced DMEM será o meio de cultura mais apropriado para obtenção de produções com boa qualidade. Este meio de cultura tem a particularidade de poder ser utilizado com pouca ou nenhuma suplementação de FBS. Ensaios experimentais indicam que comparativamente a um meio de cultura mais comum (como o DMEM, por exemplo), o Advanced DMEM suplementado com FBS a 2% equivale a DMEM com FBS a 10% (utilizado no crescimento e sub-cultura de células) e Advanced DMEM sem suplementação de FBS equivale a DMEM com FBS a 2% (utilizado nas infecções com vírus) (resultados não apresentados). Nos ensaios com infecção viral utiliza-se meio com FBS a 2%, já que este aditivo tem a capacidade de bloquear recetores celulares embora também seja indispensável à multiplicação celular. Esta concentração de FBS é, portanto, um compromisso entre a manutenção das células e a infecciosidade dos vírus com que se pretende trabalhar. Visto que Advanced DMEM não requer suplementação de FBS, nenhum recetor celular é bloqueado pelo meio de cultura e a suscetibilidade das células à infecção é teoricamente máxima, resultando em melhores produções.

3.3. Titulação na presença de E6

Os ensaios de titulação na presença de E6 foram realizados exclusivamente com o isolado LMo, nas duas linhas celulares, como *screening* inicial de eventuais efeitos antivirais deste extrato (figura 3.4).

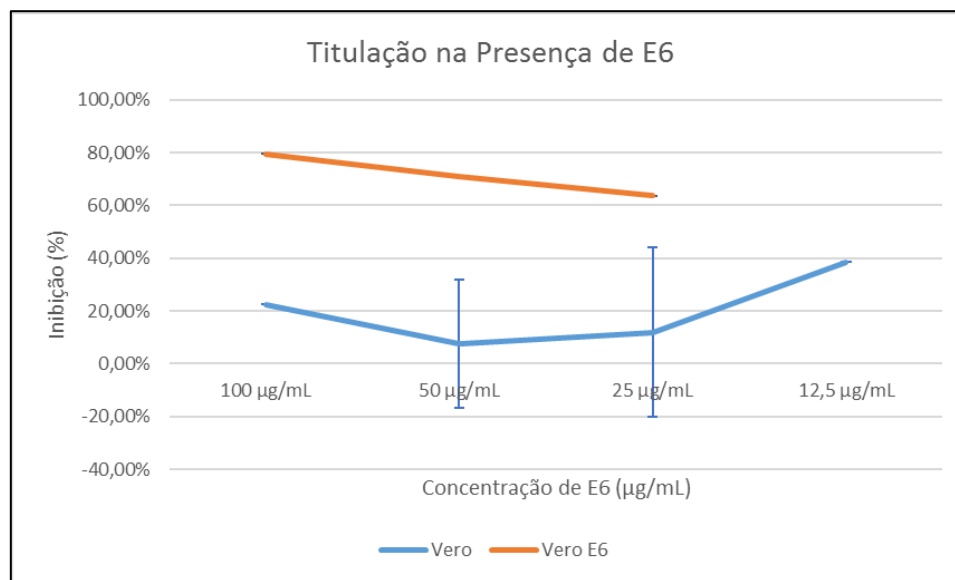


Figura 3.4 – Inibição da formação de placas virais durante a titulação do isolado LMo, na presença de E6. As barras de erro em **Vero** representam o desvio padrão calculado com base em duas experiências independentes no caso de 50 µg/mL, três experiências independentes no caso de 25 µg/mL e uma experiência no caso de 100 e 12,5 µg/mL. Os resultados de **Vero E6** foram obtidos com base em uma experiência.

Em **Vero**, os resultados não são consistentes embora todos inferiores a 40%, observando-se inibições de 22,4%, 7,5%, 12% e 38,5% quando E6 é usado a concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL, respetivamente.

Consegue-se observar inibições em **Vero E6** compreendidas entre 60% e 80%: 79,5%, 70,8% e 63,7% quando E6 é usado a concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL, respetivamente. Estes resultados bastante promissores indicam a existência de potencial efeito antiviral e, então, procurou-se realizar outros ensaios como forma de perceber exatamente qual o efeito antiviral em causa.

3.4. Efeito virucida

Relativamente aos ensaios de efeito virucida, não se observou qualquer inativação viral com E6 a 100 µg/mL, relativamente ao controlo não-tratado, tanto para o LMo (figura 3.5) como para o BoA. Este resultado foi verificado com base em quatro experiências independentes em LMo e três experiências independentes em BoA. Resultados idênticos também tinham sido obtidos para o *Herpes simplex virus* Tipo 2 (HSV-2) quando tratado com o mesmo extrato (Mendes, 2015).

Em duas experiências independentes utilizando células Vero E6, observou-se uma inativação de 50,4% quando o BoA foi incubado com E6 a 150 µg/mL, não tendo sido o mesmo observado para o LMo.

Estes resultados apontam para a inexistência de efeito virucida quando o E6 é utilizado nas concentrações não-citotóxicas habitualmente ensaiadas nos testes de efeito antiviral.

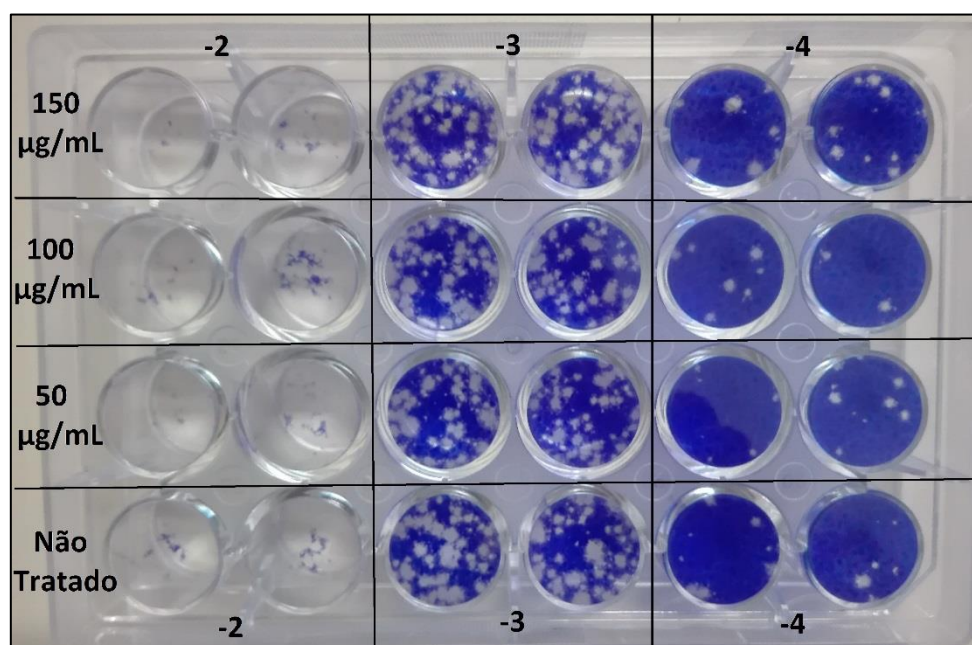


Figura 3.5 – Microplaca de titulação evidenciando maior número de placas virais formadas na titulação do vírus tratado com E6 a 150 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL, respetivamente, em relação ao vírus não-tratado com E6 (controlo). O vírus utilizado foi o LMo.

3.5. Efeito no ciclo replicativo

Como forma de determinar o IC₉₀ e o IC₅₀ do extrato E6, efetuaram-se produções virais na presença do extrato a diferentes concentrações. Essas produções foram posteriormente tituladas e os títulos comparados com produções paralelas sem adição de extrato (controle). Os resultados de inibição viral observada encontram-se na figura 3.6 e podem ser observados em microplaca na figura 3.7.

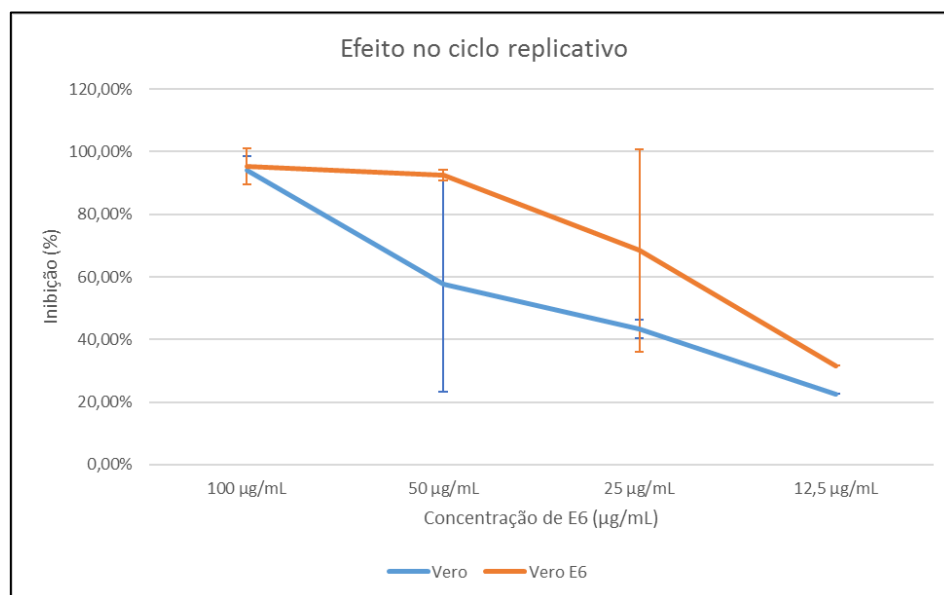


Figura 3.6 – Inibições da produção de vírus na presença de E6 observadas nas linhas celulares **Vero** e **Vero E6** com o isolado LMo, relativamente a produções paralelas sem adição de extrato (controle). Valores calculados com base em duas experiências independentes, com exceção de 12,5 µg/mL, concentração só ensaiada uma vez.

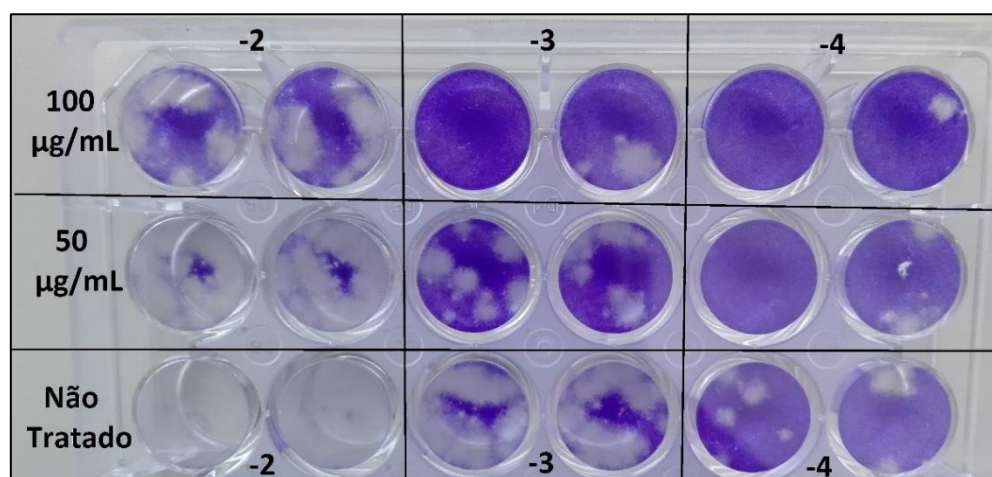


Figura 3.7 - Microplaca de titulação evidenciando menor número de placas virais na titulação do vírus produzido em células tratadas com E6 a 100 µg/mL e 50 µg/mL em relação ao vírus produzido em células não-tratadas com E6 (controle). O vírus utilizado foi o LMo.

Em Vero, observam-se inibições de 94,1%, 57,7%, 43,3% e 22,7% quando produzidos sob ação de E6 a 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL, respetivamente. Em Vero E6, as inibições observadas são de 95,4%, 92,6%, 68,4% e 31,6% quando produzidos com E6 a 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL, respetivamente.

Para este isolado, o IC₅₀ do extrato é 36,7 µg/mL e 18,8 µg/mL em Vero e Vero E6, respetivamente. O IC₉₀ do extrato é 94,3 µg/mL e 47,3 µg/mL em Vero e Vero E6, respetivamente. Estes valores foram obtidos por regressão linear da curva de dose-resposta utilizando os dois pontos mais próximos de 50% ou 90%.

Quando realizado este ensaio com FV3, utilizando E6 a 100 µg/mL, registou-se uma inibição de 95,5% em Vero e 84,9% em Vero E6 (figura 3.8). Neste caso, 100 µg/mL encontra-se perto do IC₉₀ para ambas as linhas celulares.

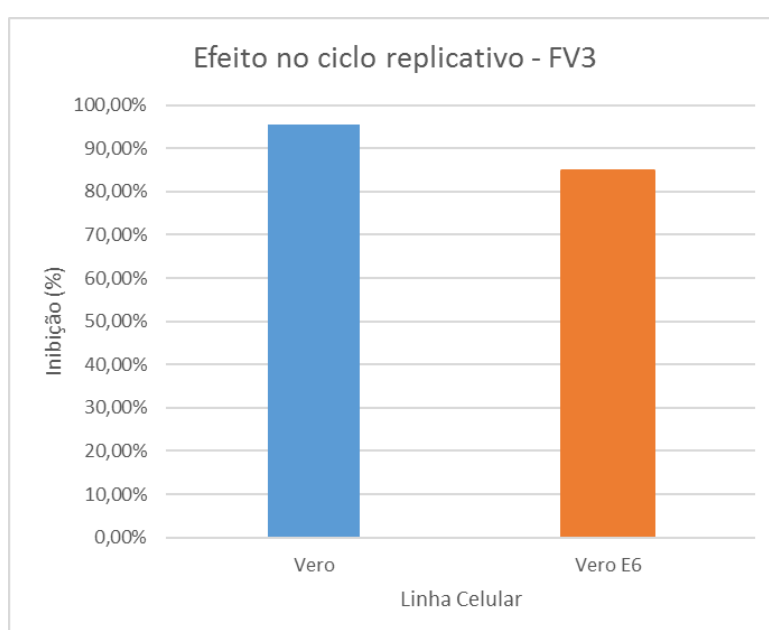


Figura 3.8 – Inibição da produção de FV3 observada nas linhas celulares Vero e Vero E6 tratadas com E6 a 100 µg/mL com o isolado FV3 quando comparadas com a produção em células controlo não-tratado. Este resultado foi obtido com base em uma experiência.

As inibições observadas são de elevada magnitude relativamente à situação controlo em células não tratadas durante a produção de vírus, verificando-se inibições de similar ordem na estirpe tipo do género *Ranavirus*, o FV3.

Um parâmetro de avaliação das potencialidades de um extrato é o Índice de Seletividade (SI). Este índice refere-se ao rácio da concentração máxima de extrato que causa uma determinada percentagem de inviabilidade celular (normalmente CC₅₀ para 50% de inviabilidade podendo também ser calculado com a CC₉₀ para 90% de inviabilidade) e a concentração mínima de extrato capaz de inibir o vírus (normalmente IC₅₀ para 50% de inibição podendo também ser calculado com a IC₉₀ para 90% de inibição). Descrições de produtos com atividade antiviral sem este índice são de pouco interesse, mesmo que tenha o efeito pretendido a concentrações muito baixas (Cos *et al*, 2006). Assim sendo, o SI do extrato E6 é 9,22. Este valor foi calculado utilizando o CC₅₀ com culturas menos confluentes de

Vero E6 e utilizando o IC₅₀ obtido com a mesma linha celular. A menor confluência por se assemelhar às condições de trabalho com vírus e a linha Vero E6 por ter sido a mesma utilizada nestes ensaios de citotoxicidade.

Dada a elevada inibição observada nestes ensaios e a inexistência de inativação observada nos ensaios de efeito virucida, pode-se deduzir que o alvo de ação do extrato E6 não será a partícula viral, nomeadamente o invólucro viral ou a cápside.

Ao contrário do referido para as duas moléculas descritas por Yu *et al.*, 2016, em que há inibição do ECP e da apoptose nas células infectadas, a infecção na presença de E6 progride de forma idêntica à ausência de tratamento, com evolução do ECP ao longo da infecção.

3.6. Caracterização molecular

3.6.1. Região microssatélite

Foi necessário otimizar um gel de agarose especial para detecção das pequenas diferenças encontradas na região microssatélite destes vírus. Assim, para se obter uma resolução máxima numa zona inferior do gel, testou-se vários tampões de corrida e várias agaroses de concentração variável em geis de menor dimensão, de forma a não desperdiçar recursos desnecessariamente. Os perfis de marcadores de massa molecular obtidos são observados na figura 3.9.

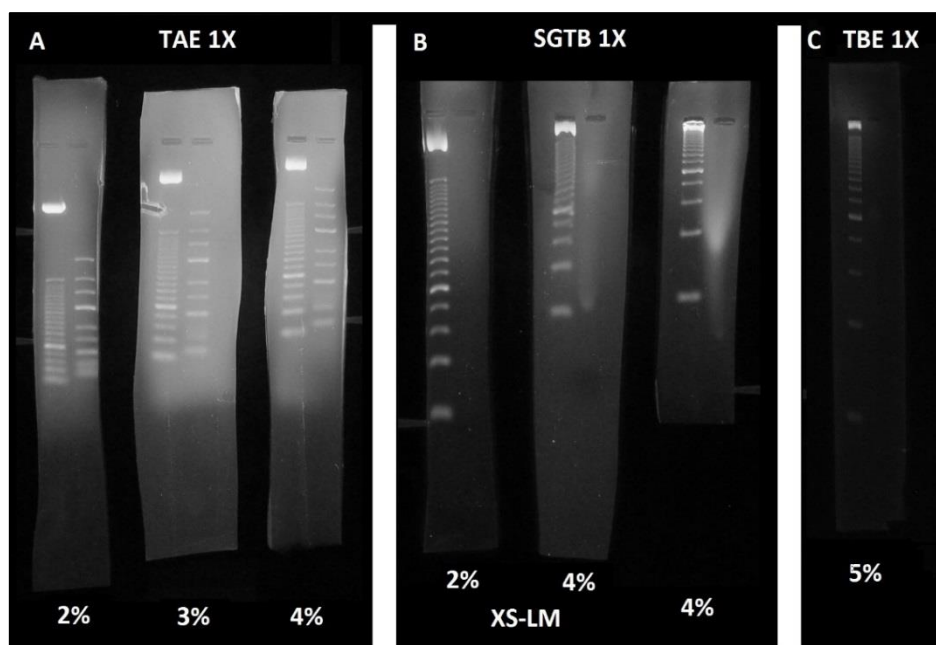


Figura 3.9 – Comparação de perfis de marcadores de massa molecular em geis de agarose, corados com EtBr. **A)** Geis de agarose de uso corrente (Agarose Electrophoresis Grade, Invitrogen) a 2%, 3% e 4% em TAE 1X. Os marcadores de massa molecular utilizados em cada gel foram o 25 bp DNA Ladder (Invitrogen) à esquerda e o GRS Low Range à direita. **B)** Geis de agarose XS-LM (GRiSP) a 2% e 4% à esquerda e centro, respetivamente, e agarose de uso corrente a 4% à direita, todos em SGTB 1X (GRiSP). O marcador de massa molecular utilizado nos três geis foi o 25 bp DNA Ladder (Invitrogen). **C)** Gel de agarose de uso corrente a 5% em TBE 1X. O marcador de massa molecular utilizado foi o 25 bp DNA Ladder.

Dos perfis obtidos, pode-se observar uma resolução semelhante entre agarose a 5% em TBE (C) e agarose a 4% em SGTB (B). Quando comparadas as diferentes agaroses (B), não se notam diferenças na zona de maior interesse (entre 50 e 75 pb).

Através do uso do *software* Image Lab, foi possível calcular as massas moleculares dos amplicões da região satélite de cada isolado. Um exemplo de um output deste *software* pode ser observado na figura 3.10 e as massas moleculares médias calculadas a partir de 4 geis distintos (isolados BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 e 2000/99) e de 1 gel (isolados FV3 e LMo) resultantes de uma única amplificação podem ser observadas na figura 3.11 e Tabela I.

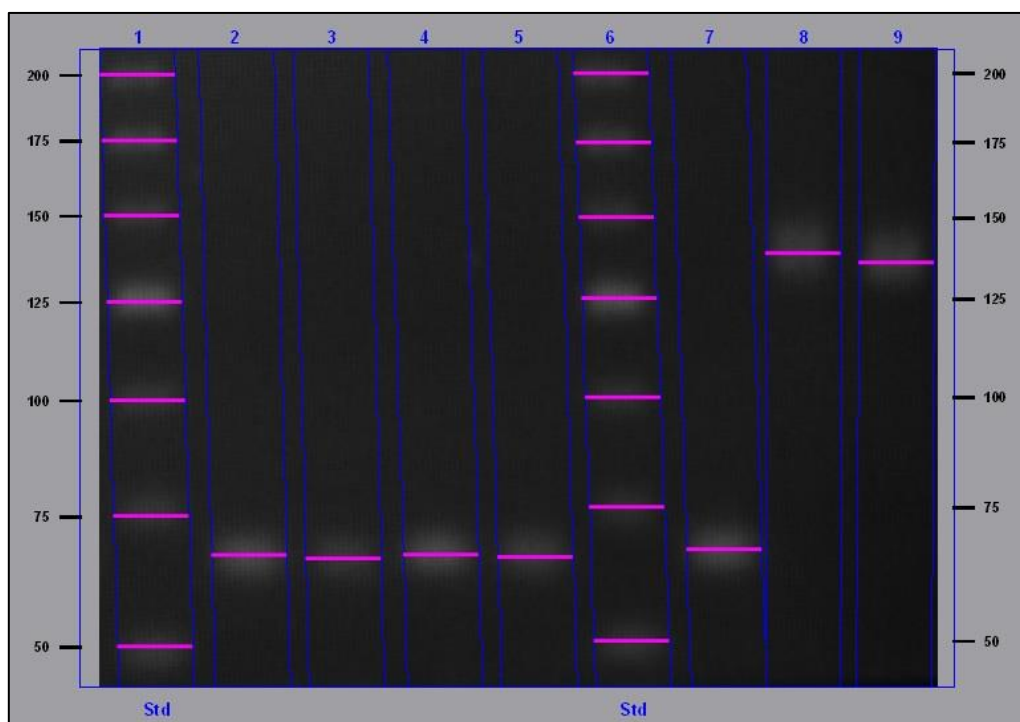


Figura 3.10 – Exemplo de *output* do *software* Image Lab. As linhas 1 e 6 correspondem ao marcador de massa molecular, neste caso o 25 bp DNA Ladder (Invitrogen). As linhas 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9 correspondem aos isolados BoA, MaP3, Ma3A, Ma3B, 2000/99, FV3 e LMo, respectivamente.

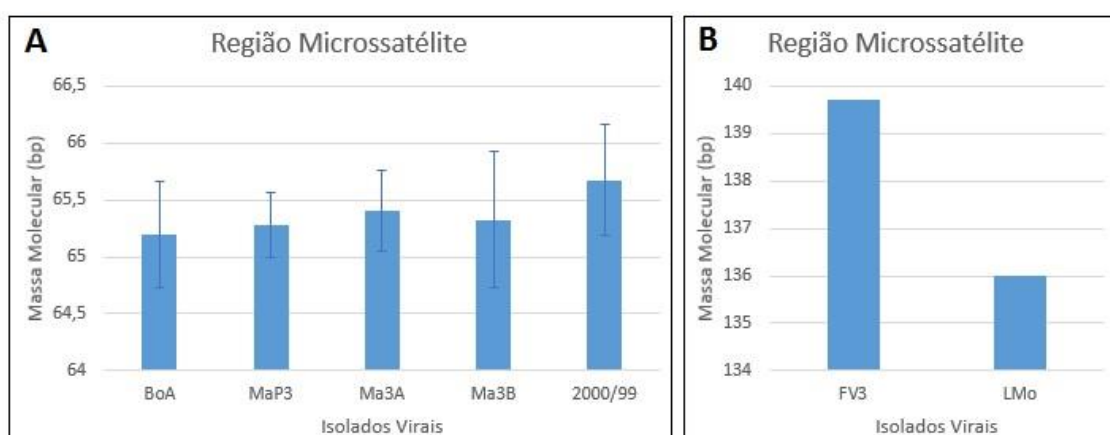


Figura 3.11 – Massas moleculares calculadas a partir do *software* Image Lab. **A)** Isolados BoA, MaP3, Ma3A, Ma3B e 2000/99 (valores médios). **B)** Isolados FV3 e LMo. As barras de erro referem-se ao desvio padrão.

Tabela I – Massas moleculares observadas e médias calculadas a partir do *software Image Lab*. Cada linha representa um ensaio experimental distinto.

	Isolados Virais						
	BoA	MaP3	Ma3A	Ma3B	2000/99	FV3	LMO
Ensaio 1	65,4	65,7	65,7	66,2	65,4		
Ensaio 2	64,6	65,2	64,9	65,2	65,5		
Ensaio 3	65,7	65,1	65,4	65	65,4		
Ensaio 4	65,1	65,1	65,6	64,9	66,4	139,7	136
Média	65,2	65,275	65,4	65,325	65,675	139,7	136

De acordo com a Tabela I, as massas moleculares observadas são de 65,2 pb para BoA, 65,275 pb para MaP3, 65,4 pb para Ma3A, 65,325 pb para Ma3B, 65,675 pb para 2000/99, 139,7 pb para FV3 e 136 pb para LMO.

Arredondando às unidades, os isolados BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 possuem 65 nucleótidos nesta região enquanto que o isolado 2000/99 possui 66 nucleótidos. Esta diferença realça a semelhança entre os isolados BoA, Ma3A, Ma3B e MaP3 (65 nucleótidos) e entre estes e o isolado 2000/99 (66 nucleótidos). Resultados equivalentes foram encontrados por Stöhr *et al.*, 2015 em que isolados da mesma espécie diferiam apenas em dois nucleótidos (ToRV1 e ToRV2). FV3 possui 140 nucleótidos enquanto que LMO possui 136 nucleótidos, que também está de acordo com a diferença de quatro nucleótidos observada por Stöhr *et al.*, 2015.

3.6.2. Proteína de reparação de DNA putativa

Desenhou-se o par de *primers* com as sequências **TGGGCATAAAAGGACTGAAACC** e **CTTCTCAAAGGCCTCGGGA**, *forward* e o *reverse*, respetivamente, tendo-se posteriormente avaliado a sua eficácia por PCR, cujo produto se analisou no gel de agarose apresentado na figura 3.12. As bandas obtidas têm cerca de 1030 nucleótidos.

Estas amostras foram subsequentemente enviadas para sequenciação, de que resultaram cromatogramas de boa qualidade, como visto na figura 3.13. Um excerto do alinhamento das sequências, obtido pelo *software BioEdit* pode ser visualizado na figura 3.14.

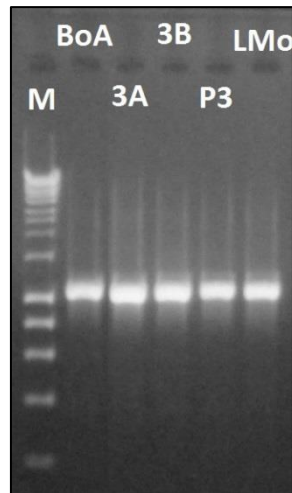


Figura 3.12 – Gel de agarose a 0,8% corado com EtBr. A Ordem das amostras é marcador de massa molecular (M) e amplicões obtidos com DNA dos seguintes isolados virais: BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 e LMo. O marcador de massa molecular utilizado foi o HyperLadder I (Bioline).

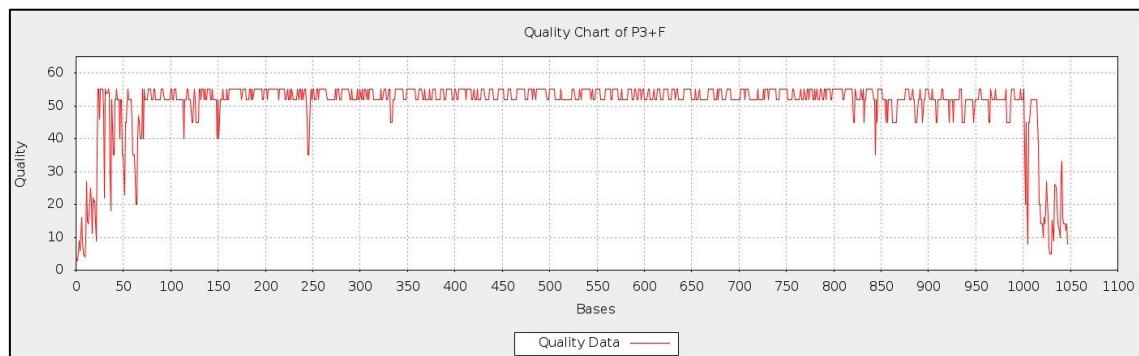


Figura 3.13 – Gráfico fornecido pela Stab Vida indicativo da qualidade da sequenciação da amostra MaP3 com o *primer Forward*.

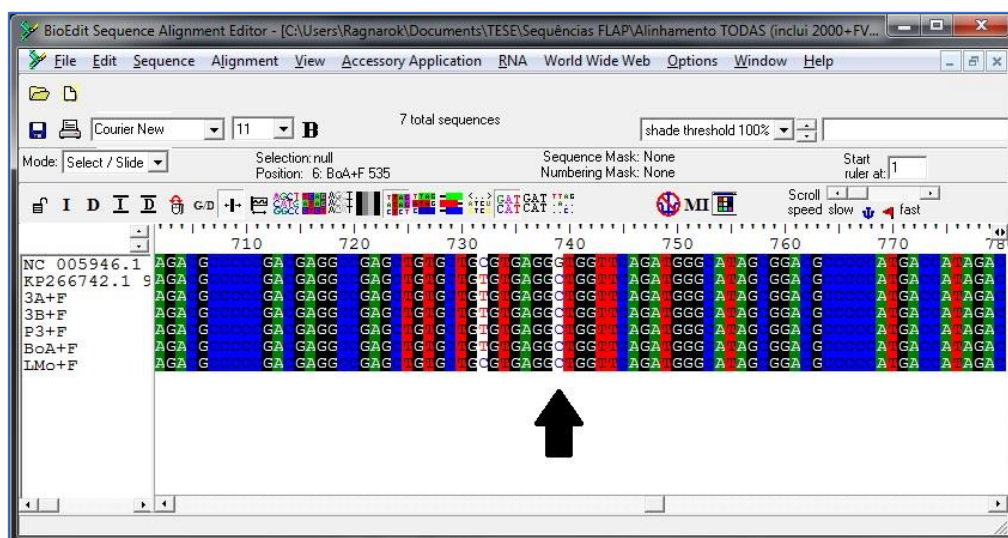
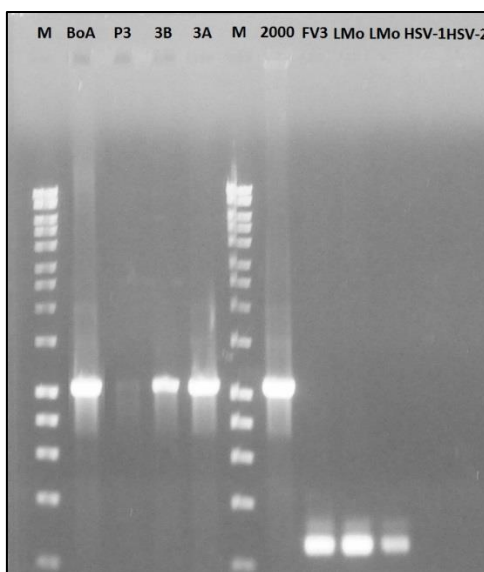


Figura 3.14 – Alinhamento das sequências das amostras. De cima para baixo, tem-se a sequência do FV3, 2000/99, Ma3A, Ma3B, MaP3, BoA e LMo. A seta a preto indica a única diferença encontrada entre o FV3 e o LMo.

Perante este cenário, conclui-se que esta região não permite realizar diferenciação entre estes vírus, mesmo considerando o nucleótido diferente entre FV3 e LMo (isolados estes muito próximos) concluindo-se assim que não é uma região com variabilidade suficiente para distinguir isolados muito próximos.

Obteve-se amplificação com sucesso utilizando os *primers* específicos para este gene (figura 3.15). Os produtos de PCR tiveram aproximadamente 250 bp para o FV3 e ambas as amostras de LMo e aproximadamente 1050 bp para os restantes cinco isolados. Utilizou-se duas amostras de HSV como controlo negativo de amplificação com estes *primers*, não tendo sido verificada qualquer amplificação.



3.7. Conclusões

Os extratos de plantas são uma fonte de moléculas cujas propriedades terapêuticas e antimicrobianas são desconhecidas, mas com enorme potencial. Em relação ao extrato E6 em particular, o próximo passo no desvendar das suas propriedades contra os iridovírus será perceber em concreto que passo/s do ciclo replicativo são afetados quando a replicação viral ocorre na presença deste extrato. Paralelamente a isto, será fundamental caracterizar e ensaiar alguns dos seus compostos maioritários em novos testes de efeito antiviral com isolados de iridovírus para compreender a origem da atividade antiviral do extrato, embora seja de admitir a possibilidade de existir um efeito sinérgico entre os vários compostos. Na eventualidade de o efeito ser apenas resultante de um composto, então seria desejável desenvolver um fármaco ou fármacos de uso veterinário para combater as grandes perdas decorrentes das infeções por estes vírus. Considerando as duas outras moléculas com potencial contra os iridovírus descritas por Yu *et al.* (2016), futuramente deverão ser experimentadas em paralelo com o extracto E6 e com o/os seu/s composto/s que venham a mostrar efeito antiviral para os iridovírus.

De qualquer forma, a existência de um produto natural com propriedades antivíricas contra estes vírus demonstra que a chave ao combate a muitas infeções complicadas pode residir nestes produtos, muitos deles de fácil obtenção e preparação, produtos estes frequentemente negligenciados pelos profissionais de saúde em prol de soluções químicas.

Como consideração final relativamente aos resultados obtidos com as abordagens moleculares para a discriminação entre isolados de ranavírus, pode-se concluir que a região microssatélite não parece ser suficiente para garantir que os isolados BoA, Ma3A, Ma3B, MaP3 e 2000/99 sejam diferentes entre si, apesar da diferença de um nucleótido que foi encontrada entre os isolados portugueses e o vírus 2000/99. Em relação ao vírus LMo, os nossos resultados também evidenciam que seja geneticamente muito próximo do FV3, podendo ser considerado uma estirpe diferente perante os resultados da análise da região microssatélite em que existe entre ambos a diferença de quatro nucleótidos, tal como descrito por Stöhr *et al.* (2015) e de sequenciação parcial da região codificante para a proteína de reparação de DNA putativa, onde foi encontrada uma diferença de apenas um nucleótido.

Os resultados deste trabalho realçam a necessidade de identificar outras regiões do genoma dos iridovírus que permitam uma melhor discriminação entre estirpes afins.

4. Referências bibliográficas

- Abdel Motaal A, Ezzat SM, Tadros MG, El-Askary HI (2016) *In vivo* anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats. *Pharmaceutical Biology* 54(12): 2864-2870.
- Alves de Matos AP, Caeiro MF, Marschang RE, Papp T, Soares C, Marçal MR, Carretero MA (2008) Adaptation of ranaviruses from Peneda-Gerês National Park (Portugal) to cell cultures and their characterization. *Microscopy and Microanalysis* 14(3): 139-40.
- Alves de Matos AP, Caeiro MF, Papp T, Matos BA, Correia AC, Marschang RE (2011) New viruses from *Lacerta monticola* (Serra da Estrela, Portugal): further evidence for a new group of núcleo-cytoplasmic large deoxyriboviruses. *Microscopy and Microanalysis* 17(1): 101-8.
- Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF (2008) Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current Protocols in Microbiology* Appendix 4:Appendix 4E.
- Ariel E, Holopainen R, Olesen NJ, Tapiovaara H (2010) Comparative study of ranavirus isolates from cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Psetta maxima*) with reference to other ranaviruses. *Archives of Virology* 155(8):1261-71.
- Barra M (2014). Actividade anti-herpética de extratos aquosos de plantas aromáticas: efeito virucida e inibição da replicação viral. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa.
- Chen LM, Wang F, Song W, Hew CL (2006) Temporal and differential gene expression of Singapore grouper iridovirus. *The Journal of General Virology* 87(Pt 10): 2907-15.
- Chinchar VG (2001) Ranaviruses (family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded killers. *Archives of Virology* 147: 447-470.
- Chinchar VG, Hyatt A, Miyazaki T, Williams T (2009) Family *Iridoviridae*: poor viral relations no longer. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 328: 123-70.
- Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* “proof-of-concept”. *Journal of ethnopharmacology* 106(3):290-302.
- Dinis M (2012) Caracterização de Iridovírus isolados de anfíbios do Parque Natural da Peneda-Gerês. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa.
- Essbauer S, Bremont M, Ahne W (2001) Comparison of the eIF-2 α homologous proteins of seven ranaviruses (*Iridoviridae*). *Virus Genes* 23: 347–359.
- Granoff A, Came PE, Rafferty KA Jr (1965) The isolation and properties of viruses from *Rana pipiens*: their possible relationship to the renal adenocarcinoma of the leopard frog. *Annals of the New York Academy of Sciences* 126(1): 237-55.
- Hyatt AD, Gould AR, Zupanovic Z, Cunningham AA, Hengstberger S, Whittington RJ, Kattenbelt J, Coupar BE (2000) Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Archives of Virology* 145(2):301-31.
- Jerrett IV, Whittington RJ, Weir RP (2015) Pathology of a Bohle-like virus infection in two Australian frog species (*Litoria splendida* and *Litoria caerulea*). *Journal of Comparative Pathology* 152(2-3): 248-59.
- Marschang RE, Braun S, Becher P (2005) Isolation of a ranavirus from a gecko (*Uroplatus fimbriatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36(2):295-300.

- Mavian C, López-Bueno A, Balseiro A, Casais R, Alcamí A, Alejo A (2012) The genome sequence of the emerging common midwife toad virus identifies an evolutionary intermediate within ranaviruses. *Journal of Virology* 86(7):3617-25.
- Mendes A (2015) Activities of an aqueous plant extract against Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV 2): role in virus replication and progeny yield. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2): 55-63.
- Nazir J, Spengler M, Marschang RE (2012) Environmental persistence of amphibian and reptilian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms* 98(3): 177-84.
- Resende F (2012) Avaliação e caracterização da atividade anti-herpética de extratos aquosos de plantas da flora portuguesa. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa.
- Rosa GM, Sabino-Pinto J, Laurentino TG, Martel A, Pasmans F, Rebelo R, Griffiths RA, Stöhr AC, Marschang RE, Price SJ, Garner TW, Bosch J (2017) Impact of asynchronous emergence of two lethal pathogens on amphibian assemblages. *Scientific Reports* 7: 43260.
- Ryan J (2008) Endotoxins and Cell Culture. Technical Bulletin. Corning Incorporated, Life Sciences.
- Santos N (2013) Avaliação da actividade antivírica de extractos aquosos de plantas da flora aromática portuguesa. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa.
- Sheets R (2000) History and characterization of the Vero cell line. *Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee*. May 12, 2000.
- Soares C, Alves de Matos AP, Arntzen JW, Carretero M, Loureiro A (2003) Amphibian mortality in a national park in the north of Portugal. *Froglog* 56
- Stöhr AC, Blahak S, Heckers KO, Wiechert J, Behncke H, Mathes K, Günther P, Zwart P, Ball I, Rüschhoff B, Marschang RE (2013). Ranavirus infections associated with skin lesions in lizards. *Veterinary Research* 44:84.
- Stöhr AC, Hoffmann A, Papp T, Robert N, Pruvost NB, Reyer HU, Marschang RE (2013) Long-term study of an infection with ranaviruses in a group of edible frogs (*Pelophylax kl. Esculentus*) and partial characterization of two viruses based on four genomic regions. *Veterinary Journal* 197(2): 238-44.
- Stöhr AC, López-Bueno A, Blahak S, Caeiro MF, Rosa GM, Matos AP, Martel A, Alejo A, Marschang RE (2015) Phylogeny and differentiation of reptilian and amphibian ranaviruses detected in Europe. *PLoS ONE* 10(2): e0118633.
- Viralzone, ExPASy: http://viralzone.expasy.org/581?outline=all_by_species
- Wang Z, Kim JH, Jang YS, Kim CH, Lee JY, Lim SS (2017) Anti-obesity effect of *Solidago virgaurea* var. *gigantea* extract through regulation of adipogenesis and lipogenesis pathways in high-fat diet-induced obese mice (C57BL/6N). *Food & Nutrition Research* 61(1): 1273479.
- Yu XB, Chen XH, Shan LP, Hao K, Wang GX (2016) *In vitro* antiviral efficacy of moroxydine hydrochloride and ribavirin against grass carp reovirus and giant salamander iridovirus. *Diseases of aquatic organisms* 121(3):189-199.